

Aus dem Lehrstuhl für Chirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Hans Jürgen Schlitt
Leiter experimentelle Chirurgie: Prof. Edward K. Geissler, PhD

der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

Inhibition von FGFR, PDGFR und VEGFR hemmt
Tumorstwachstum, Angiogenese und Metastasierung des
Pankreaskarzinoms in einem experimentellen Modell

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johannes Kai Taeger

2012

Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. dent. Torsten Reichert
1. Berichterstatter:	PD Dr. med. Sven A. Lang
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Frank Klebl
Tag der mündlichen Prüfung:	29. Januar 2013

GEWIDMET MEINER FAMILIE

Inhaltsverzeichnis

1. ZUR DISSERTATION EINGEREICHTE PUBLIKATION.....	5
2. ZUSAMMENFASSUNG DER DISSERTATION.....	6
2.1 Einleitung und Zielsetzung	6
2.2 Methodik.....	8
2.3 Ergebnisse	12
2.4 Diskussion.....	17
2.5 Abkürzungsverzeichnis.....	21
2.6 Literaturverzeichnis.....	22
3. ANHANG	28
3.1 Lebenslauf	28
3.2 Danksagung.....	31
3.3 Abdruck der Publikation.....	32

1. Zur Dissertation eingereichte Publikation

Diese Publikationsdissertation basiert auf folgender Veröffentlichung:

Targeting FGFR/PDGFR/VEGFR impairs tumor growth, angiogenesis, and metastasis by effects on tumor cells, endothelial cells, and pericytes in pancreatic cancer.

Taeger J*, Moser C*, Hellerbrand C, Mycielska ME, Glockzin G, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O, Lang SA. Mol Cancer Ther. 2011

*gleichberechtigte Erstautorenschaft

Nov;10(11):2157-67. Epub 2011 Sep 1. PubMed PMID: 21885862.

Impact factor 2011: 5,226

Der Impact Factor bezieht sich auf den *Journal Citation Report 2011* laut ISI (Institute for Scientific Information; <http://isiknowledge.com/jcr>).

Hinweis: Um dem Rahmen dieser Zusammenfassung zu entsprechen, werden exemplarisch nur ausgewählte Abbildungen gezeigt. Weitere Abbildungen sind der Originalarbeit im Anhang zu entnehmen.

2. Zusammenfassung der Dissertation

2.1 Einleitung und Zielsetzung

Mit einer relativen Inzidenz von 3% liegt das Pankreaskarzinom in den USA an zehnter Stelle im Bezug auf Krebs-Neuerkrankungen. Allerdings ist es als vierthäufigste krebsassoziierte Todesursache nach wie vor eine schwer behandelbare Krankheit mit hoher Letalität.¹ Trotz kontinuierlicher Weiterentwicklung von Diagnostik und Therapie bleibt die chirurgische Sanierung der einzig kurative Therapieansatz. Aufgrund der Diagnosestellung in meist bereits fortgeschrittenen Erkrankungsstadien kommt die chirurgische Therapie jedoch nur für die Minderheit der Patienten in Frage. Zudem ist die Rezidivquote selbst nach kurativ intendierter Resektion vergleichsweise hoch.²

Bei bösartigen Krebsleiden anderer Entitäten wurden durch gezielte Pharmakotherapie mit molekularbiologischen Angriffspunkten vielversprechende Ergebnisse bei teils relativ günstigem Nebenwirkungsprofil erzielt.³⁻¹¹ Somit könnte dieses alternative Behandlungskonzept möglicher Weise auch die Therapie des Pankreaskarzinoms entscheidend verbessern.

Die Überexpression von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) wie *fibroblast growth factor receptor* (FGFR), *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) und *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR) sowie deren entsprechende Liganden wurde beim Pankreaskarzinom mehrfach beschrieben und ist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert.¹²⁻¹⁴ So konnten mit jeweils unterschiedlicher Wichtung Effekte dieser Rezeptoren und Liganden auf Tumorzellproliferation, Chemotherapie-Resistenz, Tumorzellmotilität bzw. Metastasierungstendenz sowie die Rekrutierung von Perizyten (z.B. *vascular smooth muscle cells* – VSMCs) und Endothelzellen nachgewiesen werden.^{8,15-24} Somit liegt die Vermutung nahe, dass eine gezielte Therapie mit einem Multi-RTK-Inhibitor gegen FGFR, PDGFR und VEGFR die bisherige Behandlung von Patienten mit Pankreaskarzinom verbessern könnte.

TKI258 (vormals CHIR258; Abb. 1) bzw. 4-Amino-5-fluoro-3-[5-(4-methylpiperazin-1-yl)-1H-1,3-benzodiazol-2-yl]-1H-quinolin-2-on ist ein oral verfügbarer, ATP-kompetitiver Inhibitor mit Aktivität gegen RTKs der Klassen III, IV und V einschließlich FGFR, PDGFR und VEGFR.²⁵

In mehreren präklinischen Studien konnte die Effektivität von TKI258 in der Tumorthherapie nachgewiesen werden, u.a. beim Mammakarzinom, multiplen Myelom und Kolonkarzinom.²⁶⁻²⁹

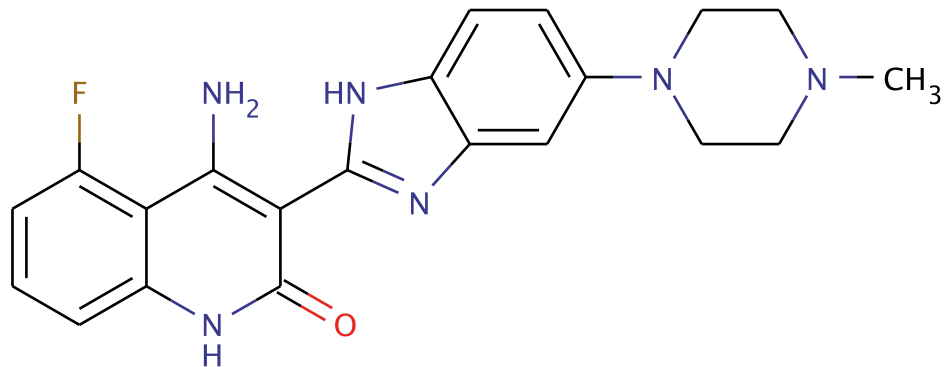


Abb. 1 | Strukturformel des RTK-Inhibitors TKI258. Modifiziert nach [25].

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit lag in der Untersuchung der Effekte einer Multi-Rezeptorblockade durch TKI258 auf Tumorzellen, Endothelzellen und Perizyten *in vitro* sowie in subkutanen und orthotopen Pankreaskarzinom-Modellen *in vivo*.

2.2 Methodik

Zellkultur

Wir verwendeten die humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien BxPC-3, L3.6pl, MiaPaCa2 und HPAF-II sowie Endothelzellen (*endothelial cells* – ECs) und glatte Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells* – VSMCs). Tumorzellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit einem Zusatz von 15% fetalem Kälberserum (*fetal calf serum* – FCS) kultiviert und bei einer 5%igen CO₂-Sättigung sowie einer Temperatur von 37°C inkubiert. Als rekombinante Wachstumsfaktoren kamen VEGF-A, PDGF-B, FGF-1, FGF-2 und FGF-7 zum Einsatz (R&D Systems). Der FGFR-/PDGFR-/VEGFR-Inhibitor TKI258 (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Novartis Oncology) wurde für Versuche *in vitro* in Dimethylsulfoxid (DMSO) bzw. für Versuche *in vivo* in Wasser gelöst.

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test (MTT-Test)

Zur Analyse der Zytotoxizität von TKI258 auf Tumorzellen, ECs und VSMCs wurde der MTT-Test angewandt. Dieser macht sich die Tatsache zunutze, dass Zellen in Abhängigkeit ihrer Vitalität den gelben Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in das blau-violette Formazan reduzieren können.³⁰ Hierzu wurden die Zellen in 96-Loch-Platten ausplattiert und verschiedenen hohen Konzentrationen von TKI258 ausgesetzt. Nach Zugabe der MTT-Lösung und Abstoppen der Reaktion mit DMSO-Lösung wurde der von den vitalen Zellen umgesetzte Farbstoff photometrisch vermessen.

Migrations-Assay

Der Effekt von TKI258 auf die Zellmotilität *in vitro* wurde mittels Migrations-Assays in modifizierten Boyden-Kammern objektiviert. Dazu wurden die Zellen in 1% FCS-DMEM resuspendiert und in die oberen Einsatzstücke mit einem Porendurchmesser von je 8 µm pipettiert. In den unteren Kammern kamen je nach Zelltyp und Versuch verschiedene chemotaktische Substanzen (FGF-1, FGF-2, FGF-7, PDGF-B, VEGF-A) und TKI258 in 10% FCS-DMEM zum Einsatz. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Die Auszählung der durch die Poren migrierten Zellen erfolgte am Mikroskop in vier zufällig gewählten Feldern.

Western Blot

Zum Nachweis des Einflusses von TKI258 auf spezifische Signal- und Rezeptorproteine kam die Western Blot Technik zum Einsatz. Dazu wurden die Zellen bei 60–70%iger Zellkonfluenz und je nach Versuch mit unterschiedlichen Konzentrationen von TKI258 und/oder Wachstumsfaktoren (VEGF-A, PDGF-B, FGF-1, FGF-2) inkubiert. Nach Lyse der Zellen mittels Lysopuffer (bestehend aus Proteininhibitor, RIPA-B-Puffer, Natriumorthovanadat und Phenylmethylsulfonylfluorid) und Zentrifugation wurde die Proteinkonzentration der Proben gemäß der Bradford-Methode photometrisch bestimmt.^{31,32} Je 40 µg der Proteinproben wurden mit einer denaturierenden Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in ihre Bestandteile aufgetrennt. Danach erfolgte der Proteintransfer von den 10%igen Laufgelelektrophoren auf Nitrozellulosemembranen. Die Membranen wurden anschließend mit spezifischen Primärantikörpern gegen phospho-Akt^{Ser473}, Akt, phospho-ERK^{Thr202/Tyr204}, ERK, phospho-STAT3^{Tyr705}, STAT3, N-Cadherin, E-Cadherin, Survivin, phospho-c-Raf^{Ser289/296/301}, phospho-c-Raf^{Ser338}, c-Raf, phospho-FAK^{Tyr925}, FAK, FGFR3, EGF-R, Hsp90 (Cell Signaling Technologies), phospho-VEGFR2, VEGFR2, PDGFRα, PDGFRβ und β-Aktin (Santa Cruz Biotechnologies) inkubiert. Nach Koppelung der Primärantikörper mit entsprechenden Sekundärantikörpern konnten diese in einer Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht werden.

Real-Time-PCR (RT-PCR)

Als Standardverfahren für Amplifikation und Nachweis spezifischer RNS wurde die RT-PCR mit dem LightCycler®-System durchgeführt, um die Auswirkungen von TKI258 auf die Expression von DLL4, EGF, FGF-2, FGFR1–3, GAPDH, Survivin, Tie2 und VEGF-A zu untersuchen. Hierzu wurde Gesamt-RNS mittels TRIzol-Reagenz extrahiert, mit Ethanol ausgefällt und in cDNA umgeschrieben. Die Primer wurden hinsichtlich MgCl₂-Konzentration und Annealing optimiert; die entstandenen PCR-Produkte wurden per Gelelektrophorese verifiziert.

Tiermodelle

Die Effekte der Multirezeptorblockade durch TKI258 *in vivo* wurden in Tumormodellen bei acht Wochen alten, männlichen Nacktmäusen (BALB/c nu/nu) untersucht. Die Tierversuche fanden mit Genehmigung des *Institutional Animal Care and Use Committee* und der Ethikkommission der Universität Regensburg statt.

Im Rahmen zweier subkutaner Tumormodelle wurden den Nacktmäusen HPAF-II- bzw. L3.6pl-Zellen (1×10^6) in die Subkutis der rechten Flanke injiziert. Bei zwei orthotopen Tumormodelle dagegen erfolgte die Injektion Metastasen bildender L3.6pl-Zellen (1×10^6) in den Pankreasschwanz.

Nach Randomisierung wurden die Mäuse in den subkutanen Modellen jeweils in zwei Gruppen ($n = 7$ /Gruppe; Kontrollgruppe, 30 mg/kg/d) eingeteilt. Den HPAF-II-beimpften Mäusen wurde täglich TKI258 mit Hilfe einer Schlundsonde verabreicht, sobald die Tumoren eine tastbare Größe erreichten. Das Experiment wurde am 28. Behandlungstag beendet. Beim subkutanen L3.6pl-Modell wurde ab einem Tumolvolumen von 400 mm^3 mit einer täglichen, siebentägigen Behandlung (30 mg/kg/d) begonnen. Nach Beendigung der Versuche wurden die subkutanen Tumoren exziiert, vermessen, gewogen und für immunhistochemische Untersuchungen vorbereitet.

Im ersten orthotopen Modellen erfolgte nach Randomisierung die Einteilung in drei Behandlungsgruppen ($n = 9\text{--}10$ /Gruppe; Kontrollgruppe, 15 mg/kg/d, 30 mg/kg/d). Sieben Tage nach Implantation der Tumorzellen begann die tägliche Behandlung der Mäuse. Nach 31 Tagen wurden die Mäuse getötet und das Vorhandensein von Leber- und Lymphknotenmetastasen überprüft. Die Tumoren wurden exziiert, vermessen, gewogen und für immunhistochemische Untersuchungen vorbereitet. In einem zweiten orthotopen Modell ($n = 8$ /Gruppe) mit bereits etablierten L3.6pl-Tumoren begann die Behandlung (30 mg/kg/d) am 15. Tag (klinisch deutlich fortgeschrittene Tumore). Sobald bei den Mäusen klinische Zeichen der Tumorerkrankung erkennbar waren, wurden diese jeweils getötet und die exziierten Tumore für Western Blot und PCR weiterverarbeitet.

Immunhistochemische Analyse von Tumervaskularisation und -zellproliferation

Die Tumoren aus den Tierversuchen wurden nach Exzision zunächst mit Einbettmedium in flüssigem Stickstoff kryofixiert. Davon wurden 8 μm dicke Kryoschnitte angefertigt, welche anschließend auf Objektträgern aufgebracht wurden.

Zur Quantifizierung der Tumervaskularisation erfolgte die immunhistochemische Anfärbung mittels eines endothelspezifischen Ratten-anti-Maus CD31-/PECAM-1 Primärantikörpers und eines Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Ratte IgG-Sekundärantikörpers nach Standard-Färbeprotokoll.³³ Die Sichtbarmachung der Antikörperbindung wurde durch Inkubation der

Kryoschnitte mit Diaminobenzidin (DAB) erreicht. Pro Tumorschnitt wurden bei 40-facher Vergrößerung im Mikroskop jeweils vier Aufnahmen im Randbereich des Tumors aufgenommen. Diese wurden in der Bildverarbeitungs-Software *ImageJ* (Version 1.33) in Graustufenbilder konvertiert und mit einem einheitlichen Schwellenwert versehen. Die Gefäßfläche wurde schließlich in Pixel/Hauptgesichtsfeld ausgegeben.

Bromdesoxyuridin (BrdU) als chemisches Analogon des Thymidins kann zur Markierung proliferierender Tumorzellen verwendet werden. Hierfür wurde den Mäusen zwei Stunden vor Beendigung des Experiments 1 mg BrdU intraperitoneal injiziert. Mit einem kommerziell erhältlichen BrdU-Detection-Kit wurde das in den Tumorzellen resorbierte BrdU nach Herstellerprotokoll nachgewiesen. Dabei wurden die Kryoschnitte mit einem anti-BrdU-Primärantikörper und einem Streptavidin-konjugiertem, Meerrettichperoxidase-markierten Ziege-anti-Maus IgG₂-Sekundärantikörper inkubiert. Die Antikörperbindung wurde mit DAB sichtbar gemacht. Pro Tumorschnitt wurden am Mikroskop vier Felder bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen, die BrdU-positiven Tumorzellen ausgezählt und deren durchschnittliche Anzahl berechnet.

Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnung erfolgten unter Anwendung der Software SigmaStat (Version 3.0). Signifikante Ausreißer bei den Ergebnissen der *in vivo* Experimente eliminierten wir mit dem Test nach Grubbs (www.graphpad.com). Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz tumorassoziierter Variablen von *in vivo* Experimenten wurden der Mann-Whitney-U-Test für nicht-parametrische Daten, die univariate Varianzanalyse (ANOVA) und der Multiple Comparisons Test nach Tukey für mehr als zwei Gruppen angewendet. Bei Überlebenszeitanalysen kam die Kaplan-Meier Methode zum Einsatz. Der Zweistichproben-t-Test diente der Signifikanzbestimmung von *in vitro* Daten. Sofern nicht anders aufgeführt, wurden alle Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

2.3 Ergebnisse

Einfluss von TKI258 auf Wachstum und Signaltransduktion bei Tumorzellen *in vitro*

Zunächst wurden Zytotoxizitätstests zur TKI258-Dosisfindung für die Tumorzelllinien BxPC-3, MiaPaCa2, HPAF-II und L3.6pl mit einer Inkubationszeit von bis zu 72 Stunden und einer Wirkstoffkonzentration von bis zu 5 $\mu\text{mol/l}$ durchgeführt. Infolge dieser Untersuchungen setzten wir für weitere *in vitro* Experimente subtoxische Konzentrationen von 0,5 und 1 $\mu\text{mol/l}$ ein.

FGF-1 gilt als wichtiges Signalmolekül im Zusammenhang mit Tumorzellproliferation und Chemotherapie-Resistenz. Bei Analysen mittels Western Blot und RT-PCR ergab sich ein positives Expressionsprofil bezüglich des FGF-Rezeptorsystems (FGF1–3) bei oben genannten Tumorzelllinien. Daher untersuchten wir den Einfluss von TKI258 auf deren Signaltransduktion. Es zeigte sich unter anderem, dass die Behandlung der Zellen mit TKI258 sowohl die konstitutive als auch FGF-1-induzierte Aktivität der *extracellular-signal regulated kinase* (ERK), einem wichtigen Mediator der onkogenen Zelltransformation,^{34,35} reduzierte (Abb. 2A).

In der Literatur finden sich Berichte über Resistenzmechanismen von MiaPaCa2-Zellen gegenüber Gemcitabin,³⁶ einem Standard-Chemotherapeutikum in der Behandlung des Pankreaskarzinoms.³⁷ Deshalb untersuchten wir die kombinierte Therapie dieser Zelllinie mit Gemcitabin und TKI258 auf mögliche synergistische Effekte. Tatsächlich konnte mit dieser Kombination im MTT-Test nach 48 und 72 Stunden eine signifikant stärkere Wachstumsinhibition im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Gemcitabin nachgewiesen werden (Abb. 2B). Außerdem wurde sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene eine dosisabhängige Minderung der Expression von Survivin beobachtet.

Zusammenfassend lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass eine Inhibition des FGF-Rezeptorsystems mit TKI258 die Erfolgsaussichten einer Therapie mit Gemcitabin verbessern könnte.

Auswirkungen von TKI258 auf die Tumorzellmotilität *in vitro*

Die Migration von Tumorzellen wird durch FGF-1-induzierte, intrazelluläre Signalkaskaden gefördert.³⁸ Die Ergebnisse unserer Migrations-Assays zeigten eine Hemmung sowohl der konstitutiven als auch der durch FGF-1-induzierten Tumorzellmotilität. Vergleichbare Resul-

tate erhielten wir nach Stimulierung mit FGF-7, welches ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Zellmigration spielt.¹⁷

Im Rahmen der weiteren Evaluierung des Einflusses von TKI258 auf die Tumorzellmotilität konnten wir eine dosisabhängige Herabregulierung von N-Cadherin und eine Heraufregulierung von E-Cadherin nachweisen. Die jeweils entgegengesetzte Konstellation wurde von Makrilia *et al.* mit erhöhter Tumorzellinvasivität und Metastasierungstendenz assoziiert.³⁹

Insgesamt betrachtet lässt die Reduktion der Tumorzellmotilität durch Multi-RTK-Blockade mit TKI258 *in vitro* einen antimetastatischen Effekt *in vivo* möglich erscheinen.

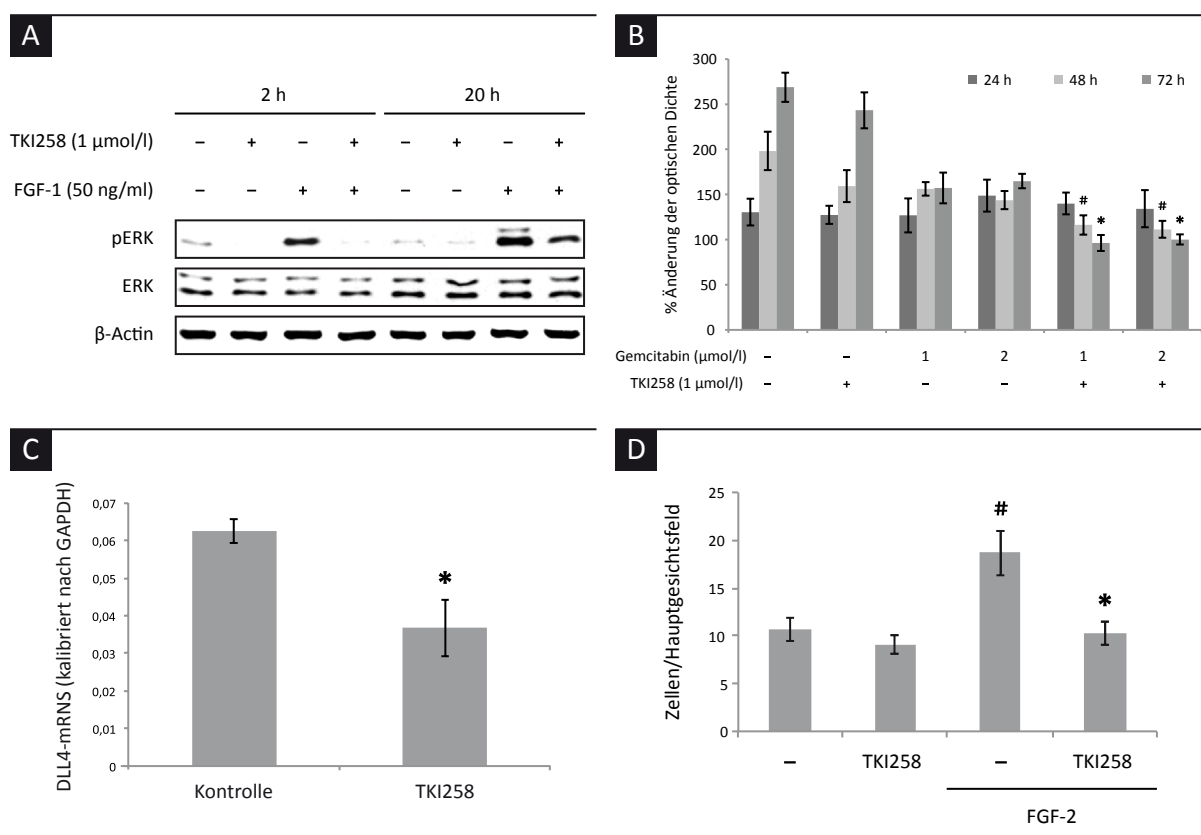


Abb. 2 | Exemplarischer Auszug einiger *in vitro* Daten. A) Western Blot Analyse; Inkubation von Tumorzellen mit TKI258 führt nach 2 und 20 Stunden zu einer Minderung der konstitutiven und FGF-1-induzierten Phosphorylierung von ERK. B) Im MTT-Test mit MiaPaCa-2-Zellen zeigte sich eine synergistische Wachstumsinhibition von Gemcitabin und TKI258 nach 48 und 72 Stunden (# und *, $P < 0.05$). C) Multi-RTK-Blockade führt bei Endothelzellen zu einer signifikant reduzierten DLL4-Expression in der RT-PCR (*, $P < 0.05$). D) Inhibition der FGF-2-induzierten Zellmotilität im Migrations-Assay bei VSMCs durch TKI258 (# und *, $P < 0.05$). B, C, D) Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts.

Effekt von TKI258 auf Endothelzellen *in vitro*

Endothelzellen als integraler Bestandteil der Angiogenese unterliegen unter anderem der Regulation durch VEGFR,¹⁹ einer weiteren Zielstruktur von TKI258. Während sich bei MTT-Assays auch nach Induktion mit VEGF-A und FGF-2 nur minimale Auswirkungen von TKI258

auf das Wachstumsverhalten von ECs zeigten, konnte mittels Western Blot Analyse eine Hemmung der VEGF-A-induzierten Phosphorylierung der *focal adhesion kinase* (FAK) beobachtet werden. Zudem wurde einerseits die konstitutive Phosphorylierung von c-Raf^{Ser289/296/301} und ERK, andererseits die FGF-2-induzierte Phosphorylierung von c-Raf^{Ser338} und ERK jeweils vermindert. Migrations-Assays bestätigten diese Erkenntnisse in Sinne einer signifikanten Hemmung der VEGF-A- bzw. FGF-2-induzierten Zellmotilität von ECs durch TKI258.

Im Hinblick auf die Beeinflussung resistenzfördernder Faktoren gegenüber anti-VEGF-Therapiekonzepten durch TKI258 untersuchten wir mittels RT-PCR Untersuchungen das DLL4- und Survivin-Expressionsprofil von ECs.⁴⁰ Für beide Faktoren konnte eine deutliche Herabregulierung durch FGFR-/PDGFR-/VEGFR-Inhibition mit TKI258 nachgewiesen werden (Abb. 2C).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TKI258 bei Endothelzellen eine Reduktion der Zellmotilität durch Blockade wachstumsfördernder Signalwegen hervorruft und zugleich die Expression von Faktoren, die mit Resistenz gegen anti-VEGF-Therapie assoziiert sind, verringern kann.

Einfluss von TKI258 auf Perizyten *in vitro*

In Kooperation mit Endothelzellen spielen Perizyten bzw. VSMCs ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Gefäßneubildung bzw. Gefäßwandstabilität von Tumoren.⁴¹ PDGF-B und FGF-2 gelten als wichtige Mediatoren der Rekrutierung von VSMCs.²⁴ In MTT-Tests zeigten sich nur minimale Auswirkungen der Behandlung mit TKI258 auf konstitutives und PDGF-B-/FGF-2-induziertes Wachstumsverhalten der VSMCs. Anhand von Western Blot Analysen wiesen wir dagegen eine Hemmung einer PDGF-B-induzierten Phosphorylierung von Akt, ERK und STAT3 nach. Die Stimulierung mit FGF-2 führte keinen entsprechenden Effekt herbei.

Eine deutliche Einschränkung der Motilität von VSMCs beobachteten wir jeweils nach Induktion mit PDGF-B und FGF-2, die konstitutive Zellmigration blieb dagegen unbeeinflusst (Abb. 2D). Auf mRNS-Ebene wurde die FGF-2- und Survivin-Expression der VSMCs deutlich durch TKI258 vermindert.

Zusammenfassend stellen diese Ergebnisse eine Hemmung der PDGF-B-/FGF-2-induzierten Rekrutierung von Perizyten durch FGFR-/PDGFR-/VEGFR-Inhibition mit TKI258 heraus.

Effekt von TKI258 auf Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierung *in vivo*

Zur Verifizierung der vielversprechenden Effekte der Multirezeptorblockade mit TKI258 *in vitro* führten wir Tumormodelle an Nacktmäusen durch.

Beim ersten orthotopen Tumormodell (wie unter 2.3 beschrieben) konnten nach Beendigung des Experimentes in den Behandlungsgruppen ein niedrigeres Tumorgewicht und ein selteneres Auftreten von Leber- und Lymphknotenmetastasen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese Ergebnisse waren jeweils in der Gruppe mit der höheren TKI258-Dosierung (30 mg/kg/d) statistisch signifikant. Die immunhistochemischen Untersuchungen zur Tumervaskularisation zeigte sich in der Behandlungsgruppe mit der höheren Dosierung eine signifikant geringere CD31-positive Gefäßfläche, während in der Gruppe mit 15 mg/kg/d kein Effekt erkennbar war (Abb. 3A). Bei der BrdU-Färbung dagegen konnten in beiden Behandlungsgruppen signifikant weniger BrdU-positive, d.h. proliferierende Tumorzellen nachgewiesen werden (Abb. 3B).

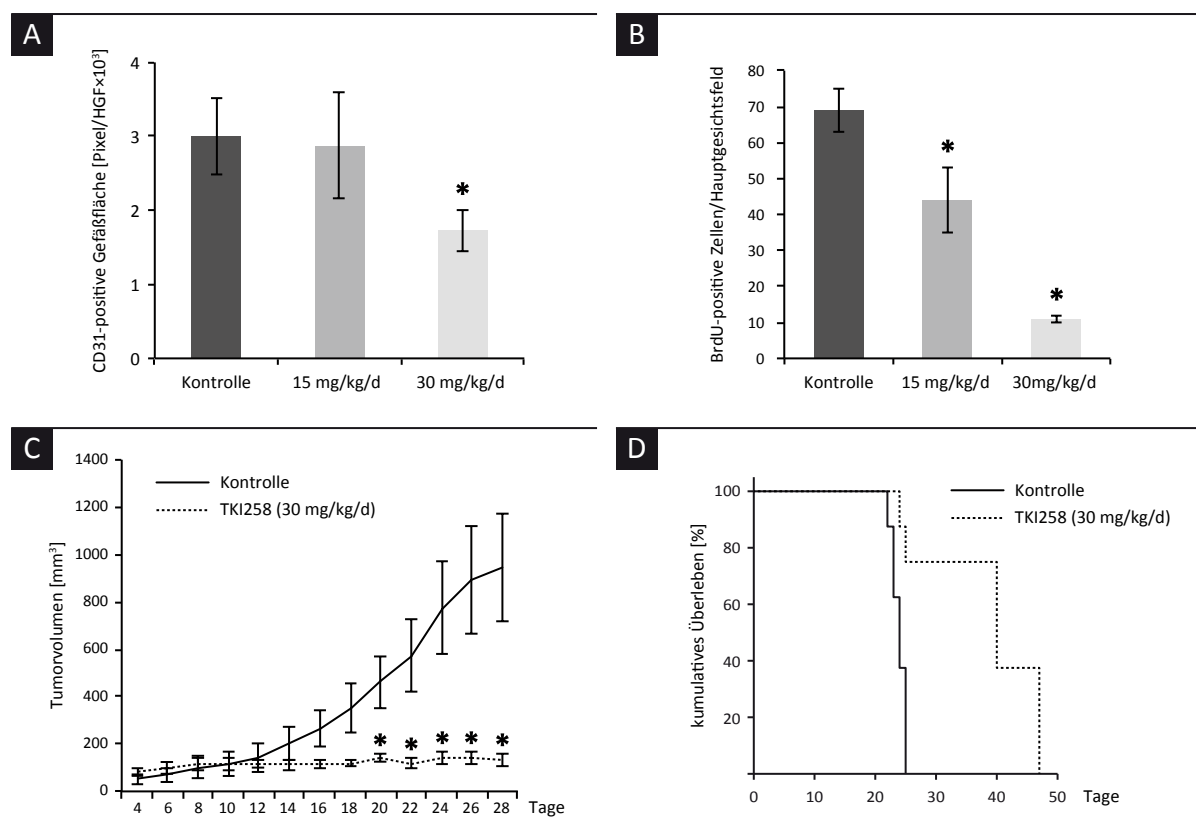


Abb. 3 | Exemplarischer Auszug einiger *in vivo* Daten. A) Immunhistochemischer Nachweis der reduzierten CD31-positiven Gefäßfläche nach TKI258-Behandlung von L3.6pl-Tumoren in einem orthotopen Modell; Signifikantes Ergebnis nur bei einer Dosierung von 30 mg/kg/d (*, $P < 0.05$). B) Jeweils signifikante Minderung BrdU-positiver Zellen in den Behandlungsgruppen (15 und 30 mg/kg/d) als Maß der Tumorzellproliferation *in vivo* (*, $P < 0.05$). C) Wachstumsinhibition subkutaner HPAF-II-Tumore bei Nacktmäusen durch Gabe von TKI258 über eine Schlundsonde (*, $P < 0.01$). D) Kaplan-Meier-Darstellung des verlängerten Überlebens durch FGFR-/PDGFR-/VEGFR-Blockade bei Nacktmäusen mit etablierten Tumoren im orthotopen Modell ($P < 0.01$ im Vergleich zur Kontrollgruppe). A, B, C) Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts.

Zusätzlich diente ein subkutanes Tumormodell mit HPAF-II-Zellen dem Ausschluss rein zelllinienspezifischer Effekte. Wieder ließ sich mit einer Dosierung von 30 mg/kg/d ein signifikant reduziertes Tumorgewicht erzielen (Abb. 3C).

Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für eine dosisabhängige Inhibition von Tumorstadium, Angiogenese und Metastasierung durch Multirezeptorblockade mit TKI258 *in vivo*.

Auswirkungen von TKI258 bei etablierten Tumoren *in vivo*

Wie eingangs erwähnt, findet die Diagnosestellung bei Patienten mit Pankreaskarzinom meist in bereits fortgeschrittenem, nicht-resektablem Stadium statt. Daher untersuchten wir den Einfluss von TKI258 auf bereits etablierte Tumoren.

Im Mausmodell mit subkutanen L3.6pl-Tumoren (Behandlungsbeginn ab einem Tumorumfang von 400 mm³) beobachteten wir in der Behandlungsgruppe ab dem sechsten Behandlungstag eine signifikante Inhibition der Tumorstadium. Die immunhistochemischen Analysen zeigten hier außerdem im Vergleich zur Kontrollgruppe verringerte Anzahlen BrdU-positiver Zellen und kleinere CD31-positive Gefäßflächen jeweils signifikanten Ausmaßes.

Diese Beobachtungen konnten in einem zweiten orthotopen Modell mit L3.6pl-Zellen bestätigt werden. So zeigten die Mäuse in der Kontrollgruppe nach einem Median von 23 Tagen, die mit TKI258 behandelten Mäuse erst nach einem Median von 40 Tagen klinische Zeichen der Tumorerkrankung (Abb. 3D). Erneut stellten wir bei den behandelten Mäusen ein verzögertes Tumorstadium fest. In Western Blot Analysen des Tumorgewebes konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit TKI258 u.a. zu einer Herabregulierung von VEGFR2, PDGFR β , FGFR3, EGFR, Hsp90 und Survivin sowie paradoxer Weise einer Heraufregulierung von PDGFR α führt. Auf mRNA-Ebene stellten wir eine Herabregulierung von VEGF-A, FGF-2 und EGF sowie eine Heraufregulierung von Tie2 und PDGF-B fest.

Aus diesen Ergebnissen leiten wir ab, dass die Multi-RTK-Inhibition mit TKI258 auch das Wachstum bereits etablierter Tumore hemmen kann.

2.4 Diskussion

Unsere *in vitro* und *in vivo* Daten zeigen, dass eine simultane Inhibition des FGF-, PDGF- und VEGF-Rezeptorsystems durch TKI258 eine effektive Möglichkeit zur Hemmung von Tumorstwachstum, Metastasierung und Angiogenese beim Pankreaskarzinom ist. Dabei ist denkbar, dass konventionelle Therapiekonzepte über die Beeinflussung von Signaltransduktion in Tumorzellen sowie antiangiogenen Effekte bei Endothelzellen und Perizyten von einer Kombination mit TKI258 profitieren könnten. Mäuse mit bereits etablierten Pankreaskarzinomen wiesen unter der Behandlung mit TKI258 signifikant längeres Überleben auf. Somit scheint es möglich, dass die Prognose dieser oft sehr spät diagnostizierten Krankheit auch bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf durch eine Multirezeptorblockade verbessert werden könnte.

Bisherige Studien konnten ähnliche Effekte von TKI258 im Rahmen von Tumormodellen anderer Entitäten nachweisen, allerdings mit dem Hauptaugenmerk auf die Hemmung der Aktivität von PDGFR β und VEGFR2.^{28,42} In einem neueren Bericht wurde postuliert, dass die inhibitorische Komponente auf das FGF-Rezeptorsystem ein ganz entscheidender Mechanismus in der Wirkungsweise von TKI258 ist.²⁷ Tatsächlich beobachteten wir in unseren Experimenten Auswirkungen auf die jeweils FGF-1-induzierte ERK-Phosphorylierung und Tumorzellmotilität durch FGFR-Blockade mit TKI258.

Die Effektivität von TKI258 sehen wir zusätzlich in der verminderten Expression von Survivin begründet, welches als wichtiger Faktor in der Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie gilt.^{43,44} Dies bestätigte sich in der durch TKI258 gesteigerten Wachstumsinhibition von MiaPaCa2-Zellen in Kombinationsbehandlung mit Gemcitabin. Somit scheint TKI258 beim Pankreaskarzinom durch Hemmung des FGF-Rezeptorsystems zu einer Reduktion der Invasivität einerseits und zu einer Steigerung der Chemosensitivität gegenüber Gemcitabin andererseits zu führen.

Die FGFR-Blockade durch TKI258 spielt auch bei der Tumorangio-genese eine entscheidende Rolle. So wurde FGF-2 zusammen mit VEGF-A als wichtiger Mediator der Endothelzellrekrutierung identifiziert.^{18,19} Zudem vermittelt FGF-2 über die Aktivierung der Raf-1-Kinase Chemosensistenz dieser Zellen.⁴⁵ Unsere *in vitro* Experimente zeigten eine Hemmung verschiedener Signalwege (u.a. ERK, FAK, c-Raf) und der VEGF-A- bzw. FGF-2-induzierten En-

dothelzellmotilität. Darüber hinaus ließ sich unter dem Einfluss von TKI258 eine signifikante Minderung der Expression von Survivin und DLL4 feststellen, was insofern von Bedeutung ist, als DLL4 laut Literatur bei verschiedenen Tumormodellen Resistenz gegen anti-VEGF Therapie vermittelt.^{40,46,47} Im Zusammenhang mit Perizyten, welche einen weiteren Grundpfeiler der Angiogenese darstellen, wurde ein synergistischer Effekt von FGF-2 und PDGF-B bei Metastasierung und Gefäßneubildung beschrieben.²⁴ Durch Multirezeptorblockade mit TKI258 wurde eine Hemmung der PDGF-B-induzierten Signaltransduktion (Akt, ERK) und der Perizytenmigration hervorgerufen. Die Auswirkungen auf Endothelzellen und Perizyten lässt darauf schließen, dass TKI258 bisherige anti-VEGF-Therapiekonzepte in ihrer Wirksamkeit unterstützen könnte.

In einem orthotopen Mausmodell bestätigten sich die Ergebnisse der *in vitro* Experimente im Sinne einer signifikanten, dosisabhängigen Inhibition des Tumorwachstums. Dass dieser Effekt vor allem in der Behandlungsgruppe mit der höheren Dosierung (30 mg/kg/d) ausgeprägt war, könnte in antiangiogenen Effekten von TKI258 begründet liegen. So war die CD31-positive Gefäßfläche ebenfalls nur in dieser Gruppe verringert. Verglichen mit anderen experimentellen Studien handelt es sich nichtsdestotrotz bei 30 mg/kg/d um eine relativ niedrige Dosierung.^{27,28,42,48}

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Migrations-Analysen stellten wir im orthotopen Modell eine signifikante Hemmung der Lymphknotenmetastasierung fest. Dies ist jedoch insofern kritisch zu beurteilen, als in anderen präklinischen Studien zum Pankreaskarzinom über eine PDGFR- und/oder VEGFR-Inhibition vergleichbare Resultate erzielt werden konnten,⁴⁹⁻⁵¹ welche sich in darauf folgenden klinischen Studien nicht bestätigten ließen.⁵²⁻⁵⁴ Dem wiederum ist entgegenzusetzen, dass mit TKI258 neben einer PDGFR- und VEGFR- zusätzlich eine FGFR-Blockade hervorgerufen wird, was der Therapie zusätzliche Effektivität verleihen könnte.

Zur Beurteilung der Wirkung von TKI258 in fortgeschrittenen Krankheitsstadien haben wir Mausmodelle mit bereits etablierten Tumoren durchgeführt. Dabei wiesen subkutane Tumore unter Multirezeptorblockade eine signifikante Wachstumsinhibition bei immunhistochemisch nachgewiesener Reduktion von Tumorzellproliferation und CD31-positiver Gefäßflächen auf. Im orthotopen Modell mit etablierten Tumoren konnten diese Ergebnisse im Sinne eines signifikant längeren Überlebens der mit TKI258 (30 mg/kg/d) behandelten Mäuse veri-

fiziert werden. Lee *et al.* konnten zwar in einem ähnlichen Tumormodell mit etablierten Kolonkarzinomen bei Mäusen ebenfalls eine Einschränkung des Tumorwachstums nachweisen, allerdings mit TKI258-Dosierungen von 60 bzw. 120 mg/kg/d.²⁸ Somit ist denkbar, dass die antiangiogenen und antiproliferativen Effekte von TKI258 weit unterhalb der maximal tolerierbaren Dosis erreicht werden können.⁵⁵ Gerade in Kombination mit konventioneller Chemotherapie könnten dies zu besseren Behandlungsergebnissen beitragen.

In aktuellen Studien zur Resistenzentwicklung gegen VEGF-Inhibitoren wurde die Assoziation mit einer Überexpression von EGF- und FGF-Rezeptoren in Stromazellen herausgestellt.⁵⁶ Entsprechend dazu beobachteten wir bei Tumoren nach RTK-Blockade eine Herabregulierung der FGFR3- und EGFR-Expression. Entgegen der Tatsache, dass PDGFR zu den Zielstrukturen von TKI258 zählt, wiesen wir außerdem eine Heraufregulierung von PDGFR α nach. Dies ist von besonderem Interesse, da PDGFR α u.a. beim Mammakarzinom und dem hepatozellulären Karzinom mit Neigung zu Metastasenbildung und Aggressivität der Tumore in Zusammenhang gebracht wurde.^{57,58} Ferner wird PDGF-C, der Hauptligand von PDGFR α , verstärkt bei tumorassoziierten Fibroblasten exprimiert, welche wiederum Resistenz gegen anti-VEGF Therapie vermitteln.⁵⁹ Dennoch lässt sich insgesamt aus diesen Experimenten ableiten, dass TKI258 selbst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien Effektivität in der Tumorbehandlung aufweisen könnte.

Anzumerken ist, dass es selbst bei *targeted therapies*, also hochspezifischen, zielgerichteten Pharmakotherapiekonzepten mit molekularbiologischen Angriffspunkten, zu erheblichen Nebenwirkungen kommen kann.⁶⁰⁻⁶² So wurde beispielsweise in einer Fallstudie von Lorient *et al.* berichtet, dass bei einem Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom unter Behandlung mit TKI258 neuropathische Schmerzen aufgetreten seien.⁶³ Denkbar wäre, dass die Inhibition des FGF-Rezeptorsystems, welches eine wichtige Rolle bei neuronalen Entwicklungs- und Reparaturprozessen spielt, zu Nervenschädigung führt.⁶⁴ Als weitere Nebenwirkungen von TKI258 werden in der Literatur unter anderem Übelkeit, Müdigkeit, Diarrhoe, Bluthochdruck, Anorexie und Erhöhung der alkalischen Phosphatase genannt.^{55,65}

Laut den *U.S. National Institutes of Health* (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=tki258>; abgerufen am 12.03.2012) ist TKI258 aktuell unter dem Handelsnamen Dovitinib Gegenstand zahlreicher klinischer Studien, darunter in einer Phase-III-Studie zum Nierenzellkarzinom und

einigen Phase-II-Studien (u.a. Endometriumkarzinom, multiples Myelom, Blasenkarzinom, Prostatakarzinom).

Ob TKI258 bzw. Dovitinib auf lange Sicht erfolgreich in der Therapie des Pankreaskarzinoms eingesetzt werden kann, ist zwar noch unklar. Wir sind aber aufgrund unserer Forschungsergebnisse der Überzeugung, dass die kombinierte Blockade des FGF-, PDGF- und VEGF-Rezeptorsystems eine vielversprechende Behandlungsalternative des humanen Pankreaskarzinoms darstellt, die in weiteren klinischen Studien evaluiert werden sollte.

2.5 Abkürzungsverzeichnis

BrdU	Bromdesoxyuridin
CD	<i>engl.:</i> cluster of differentiation
DAB	Diaminobenzidin
DLL	<i>engl.:</i> delta like ligand
DMEM	<i>engl.:</i> Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EC	<i>engl.:</i> endothelial cell
EGF	<i>engl.:</i> epidermal growth factor
ERK	<i>engl.:</i> extracellular-signal regulated kinase
FAK	<i>engl.:</i> focal adhesion kinase
FCS	<i>engl.:</i> fetal calf serum
FGF	<i>engl.:</i> fibroblast growth factor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HGF	Hauptgesichtsfeld
Hsp	Hitzeschockprotein
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PDGF	<i>engl.:</i> platelet-derived growth factor
PECAM	<i>engl.:</i> platelet/endothelial cell adhesion molecule
Raf	<i>engl.:</i> rapidly growing fibrosarcoma [Protein]
RIPA	<i>engl.:</i> radio-immunoprecipitation assay
RNS	Ribonukleinsäure
RT-PCR	<i>engl.:</i> real-time polymerase chain reaction
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
STAT	<i>engl.:</i> signal transducers and activators of transcription
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
VEGF	<i>engl.:</i> vascular endothelial growth factor
VSMC	<i>engl.:</i> vascular smooth muscle cell

2.6 Literaturverzeichnis

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62:10-29.
2. Artinyan A, Anaya DA, McKenzie S, Ellenhorn JD, Kim J. Neoadjuvant therapy is associated with improved survival in resectable pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2011;117:2044-9.
3. Eisen T, Sternberg CN, Robert C, et al. Targeted therapies for renal cell carcinoma: review of adverse event management strategies. *J Natl Cancer Inst* 2012;104:93-113.
4. Xu BH, Jiang ZF, Chua D, et al. Lapatinib plus capecitabine in treating HER2-positive advanced breast cancer: efficacy, safety, and biomarker results from Chinese patients. *Chinese journal of cancer* 2011;30:327-35.
5. Jarkowski A, Sweeney RP. Nilotinib: a new tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Pharmacotherapy* 2008;28:1374-82.
6. Patel R, Leung HY. Targeting the EGFR-family for Therapy: Biological Challenges and Clinical Perspective. *Current pharmaceutical design* 2012.
7. Lammers T. Nanomedicine on the move: from monotherapeutic regimens to combination therapies. *Expert review of clinical pharmacology* 2012;5:105-8.
8. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
9. Kundu SK, Nestor M. Targeted therapy in head and neck cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2012.
10. Riccardi F, Rizzo M, Festino L, et al. Therapy innovation for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *Expert opinion on therapeutic targets* 2012.
11. Chan SL, Yeo W. Targeted therapy of hepatocellular carcinoma: Present and Future. *J Gastroenterol Hepatol* 2012.
12. Giroux V, Dagorn JC, Iovanna JL. A review of kinases implicated in pancreatic cancer. *Pancreatology* 2009;9:738-54.

13. Kuwahara K, Sasaki T, Kuwada Y, Murakami M, Yamasaki S, Chayama K. Expressions of angiogenic factors in pancreatic ductal carcinoma: a correlative study with clinicopathologic parameters and patient survival. *Pancreas* 2003;26:344-9.
14. Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, et al. Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res* 1993;53:5289-96.
15. El-Hariry I, Pignatelli M, Lemoine NR. FGF-1 and FGF-2 regulate the expression of E-cadherin and catenins in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2001;94:652-61.
16. Nomura S, Yoshitomi H, Takano S, et al. FGF10/FGFR2 signal induces cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2008;99:305-13.
17. Niu J, Chang Z, Peng B, et al. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7-regulated cell migration and invasion through activation of NF-kappaB transcription factors. *J Biol Chem* 2007;282:6001-11.
18. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews Cancer* 2003;3:401-10.
19. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005;438:967-74.
20. Hwang RF, Moore T, Arumugam T, et al. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res* 2008;68:918-26.
21. Murakami M, Nguyen LT, Hatanaka K, et al. FGF-dependent regulation of VEGF receptor 2 expression in mice. *J Clin Invest* 2011;121:2668-78.
22. Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *The Journal of cell biology* 1998;141:1659-73.
23. Tsunoda S, Nakamura T, Sakurai H, Saiki I. Fibroblast growth factor-2-induced host stroma reaction during initial tumor growth promotes progression of mouse melanoma via vascular endothelial growth factor A-dependent neovascularization. *Cancer science* 2007;98:541-8.

24. Nissen LJ, Cao R, Hedlund EM, et al. Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis. *J Clin Invest* 2007;117:2766-77.
25. Renhowe PA, Pecchi S, Shafer CM, et al. Design, structure-activity relationships and in vivo characterization of 4-amino-3-benzimidazol-2-ylhydroquinolin-2-ones: a novel class of receptor tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem* 2009;52:278-92.
26. Chase A, Grand FH, Cross NC. Activity of TKI258 against primary cells and cell lines with FGFR1 fusion genes associated with the 8p11 myeloproliferative syndrome. *Blood* 2007;110:3729-34.
27. Dey JH, Bianchi F, Voshol J, Bonenfant D, Oakeley EJ, Hynes NE. Targeting fibroblast growth factor receptors blocks PI3K/AKT signaling, induces apoptosis, and impairs mammary tumor outgrowth and metastasis. *Cancer Res* 2010;70:4151-62.
28. Lee SH, Lopes de Menezes D, Vora J, et al. In vivo target modulation and biological activity of CHIR-258, a multitargeted growth factor receptor kinase inhibitor, in colon cancer models. *Clin Cancer Res* 2005;11:3633-41.
29. Xin X, Abrams TJ, Hollenbach PW, et al. CHIR-258 is efficacious in a newly developed fibroblast growth factor receptor 3-expressing orthotopic multiple myeloma model in mice. *Clin Cancer Res* 2006;12:4908-15.
30. Hatok J, Babusikova E, Matakova T, Mistuna D, Dobrota D, Racay P. In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. *Clinical and experimental medicine* 2009;9:1-7.
31. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976;72:248-54.
32. Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical biochemistry* 1985;151:369-74.
33. Stoeltzing O, Ahmad SA, Liu W, et al. Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors. *Cancer Res* 2003;63:3370-7.

34. Xiong HQ. Molecular targeting therapy for pancreatic cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2004;54 Suppl 1:S69-77.
35. Ding XZ, Hennig R, Adrian TE. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. *Molecular cancer* 2003;2:10.
36. Giroux V, Malicet C, Barthet M, et al. p8 is a new target of gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006;12:235-41.
37. Koido S, Homma S, Takahara A, et al. Current immunotherapeutic approaches in pancreatic cancer. *Clinical & developmental immunology* 2011;2011:267539.
38. Liu J, Huang C, Zhan X. Src is required for cell migration and shape changes induced by fibroblast growth factor 1. *Oncogene* 1999;18:6700-6.
39. Makrilia N, Kollias A, Manolopoulos L, Syrigos K. Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. *Cancer Invest* 2009;27:1023-37.
40. Yan M, Plowman GD. Delta-like 4/Notch signaling and its therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2007;13:7243-6.
41. von Tell D, Armulik A, Betsholtz C. Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res* 2006;312:623-9.
42. Lopes de Menezes DE, Peng J, Garrett EN, et al. CHIR-258: a potent inhibitor of FLT3 kinase in experimental tumor xenograft models of human acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2005;11:5281-91.
43. Liu WS, Yan HJ, Qin RY, et al. siRNA directed against survivin enhances pancreatic cancer cell gemcitabine chemosensitivity. *Dig Dis Sci* 2009;54:89-96.
44. Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, Davies CL, Markham AF, Guillou PJ. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002;86:886-92.
45. Alavi AS, Acevedo L, Min W, Cheresch DA. Chemoresistance of endothelial cells induced by basic fibroblast growth factor depends on Raf-1-mediated inhibition of the proapoptotic kinase, ASK1. *Cancer Res* 2007;67:2766-72.

46. Ridgway J, Zhang G, Wu Y, et al. Inhibition of DLL4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 2006;444:1083-7.
47. Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, et al. Blockade of DLL4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 2006;444:1032-7.
48. Trudel S, Li ZH, Wei E, et al. CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4;14) multiple myeloma. *Blood* 2005;105:2941-8.
49. Dineen SP, Sullivan LA, Beck AW, et al. The Adnectin CT-322 is a novel VEGF receptor 2 inhibitor that decreases tumor burden in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2008;8:352.
50. Hwang RF, Yokoi K, Bucana CD, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor phosphorylation by STI571 (Gleevec) reduces growth and metastasis of human pancreatic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Clin Cancer Res* 2003;9:6534-44.
51. Yokoi K, Sasaki T, Bucana CD, et al. Simultaneous inhibition of EGFR, VEGFR, and platelet-derived growth factor receptor signaling combined with gemcitabine produces therapy of human pancreatic carcinoma and prolongs survival in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res* 2005;65:10371-80.
52. Al-Batran SE, Atmaca A, Schleyer E, et al. Imatinib mesylate for targeting the platelet-derived growth factor beta receptor in combination with fluorouracil and leucovorin in patients with refractory pancreatic, bile duct, colorectal, or gastric cancer--a dose-escalation Phase I trial. *Cancer* 2007;109:1897-904.
53. Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D, et al. Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J Clin Oncol* 2010;28:3617-22.
54. Kindler HL, Wroblewski K, Wallace JA, et al. Gemcitabine plus sorafenib in patients with advanced pancreatic cancer: a phase II trial of the University of Chicago Phase II Consortium. *Invest New Drugs* 2012;30:382-6.
55. Sarker D, Molife R, Evans TR, et al. A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of TKI258, an oral, multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14:2075-81.

56. Cascone T, Herynk MH, Xu L, et al. Upregulated stromal EGFR and vascular remodeling in mouse xenograft models of angiogenesis inhibitor-resistant human lung adenocarcinoma. *J Clin Invest* 2011;121:1313-28.
57. Carvalho I, Milanezi F, Martins A, Reis RM, Schmitt F. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in breast cancer is associated with tumour progression. *Breast cancer research : BCR* 2005;7:R788-95.
58. Zhang T, Sun HC, Xu Y, et al. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in endothelial cells of hepatocellular carcinoma associated with high metastatic potential. *Clin Cancer Res* 2005;11:8557-63.
59. Crawford Y, Kasman I, Yu L, et al. PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell* 2009;15:21-34.
60. Middleton G, Ghaneh P, Costello E, Greenhalf W, Neoptolemos JP. New treatment options for advanced pancreatic cancer. *Expert review of gastroenterology & hepatology* 2008;2:673-96.
61. Ravaud A. Treatment-associated adverse event management in the advanced renal cell carcinoma patient treated with targeted therapies. *Oncologist* 2011;16 Suppl 2:32-44.
62. Hasinoff BB, Patel D. The lack of target specificity of small molecule anticancer kinase inhibitors is correlated with their ability to damage myocytes in vitro. *Toxicology and applied pharmacology* 2010;249:132-9.
63. Loriot Y, Massard C, Angevin E, Lambotte O, Escudier B, Soria JC. FGFR inhibitor induced peripheral neuropathy in patients with advanced RCC. *Ann Oncol* 2010;21:1559-60.
64. Jungnickel J, Gransalke K, Timmer M, Grothe C. Fibroblast growth factor receptor 3 signaling regulates injury-related effects in the peripheral nervous system. *Molecular and cellular neurosciences* 2004;25:21-9.
65. Kim KB, Chesney J, Robinson D, Gardner H, Shi MM, Kirkwood JM. Phase I/II and pharmacodynamic study of dovitinib (TKI258), an inhibitor of fibroblast growth factor receptors and VEGF receptors, in patients with advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 2011;17:7451-61.

3. Anhang

3.1 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Johannes Kai Taeger
Geburtsdatum	28. Oktober 1985
Geburtsort	München
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Prof. Dr. med. Kai Taeger – Anästhesist (Ruhestand) Christina Taeger – Kunsttherapeutin
Geschwister	Dr. med. Christian Taeger – Arzt in Weiterbildung Daniel Taeger – Diplom-Betriebswirt, Geschäftsführer

Ausbildung

1992 – 1996	Grundschule Prüfening, Regensburg
1996 – 2005	Goethe-Gymnasium Regensburg – Allg. Hochschulreife
2005 – 2011	Medizinstudium an der Universität Regensburg

Famulaturen

02/2008 – 03/2008	Innere Medizin/Gastroenterologie, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Regensburg
08/2008 – 10/2008	Laborfamulatur: Tumorforschung mit Schwerpunkt auf Angiogenese und Metastasierung, Universitätsklinikum Regensburg
03/2009 – 04/2009	Notaufnahme, Allg. Krankenhaus Wien, Österreich

09/2009 – 10/2009	Anästhesiologie, Poole Hospital NHS Foundation Trust, Großbritannien
03/2010 – 04/2010	Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg
04/2010	Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Klinikum rechts der Isar, München

Praktisches Jahr

8/2010 – 12/2010	Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Klinikum Passau
12/2010 – 02/2011	Innere Medizin, Universitätsklinikum Regensburg
02/2011 – 04/2011	Kardiologie, Barts and The London NHS Trust, Großbritannien
04/2011 – 07/2011	Chirurgie, Stadtspital Waid Zürich, Schweiz

Aktuelle Tätigkeit

seit 04/2012	Assistenzarzt am Universitätsklinikum Würzburg in der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plas- tische und ästhetische Operationen
---------------------	--

Forschung

"Inhibition von FGFR, PDGFR und VEGFR hemmt Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierung des Pankreaskarzinoms in einem experimentellen Modell" (Dissertation, Ergebnisse publiziert; Abteilung für experimentelle Chirurgie, Betreuer: PD Dr. med. Sven A. Lang, Universitätsklinikum Regensburg)

- Publikation im AACR-Journal Molecular Cancer Therapeutics (IF 2010: 5.225):
*"Targeting FGFR/PDGFR/VEGFR impairs tumor growth, angiogenesis and meta-
stasis by effects on tumor cells, endothelial cells and pericytes in pancreatic*

cancer"; J. Taeger*, C. Moser*, C. Hellerbrand, M. E. Mycielska, G. Glockzin, H. J. Schlitt, E. K. Geissler, O. Stöltzing, S. A. Lang (* geteilte Erstautorenschaft)

- ▶ Auszeichnung des Universitätsklinikums Regensburg oben genannter Publikation zum "Glanzlicht biomedizinischer Forschung" 06/2012
- ▶ Posterbeitrag beim Gastrointestinal Cancers Symposium der American Society of Clinical Oncology, Orlando, 2009: *"Effects of TKI258, a novel FGFR/PDGFR/VEGFR inhibitor, on pancreatic cancer cells, endothelial cells and pericytes"*; S. A. Lang, J. Taeger, C. Hackl, C. Moser, H. J. Schlitt, E. K. Geissler, O. Stöltzing
- ▶ Vortrag bei der 86. Jahrestagung der Vereinigung der Bayerischen Chirurgen e.V., Augsburg, 2009: *"Inhibition des FGF/PDGF/VEGF Rezeptorsystems hemmt Wachstum und Metastasierung des Pankreaskarzinoms in einem experimentellen Modell"*; J. Taeger, S. A. Lang, C. Hackl, C. Moser, H. J. Schlitt, E. K. Geissler, O. Stöltzing

Kenntnisse/Interessen

Fremdsprachen	Englisch, Latein, Französisch
Soziales Engagement	Präsident des gemeinnützigen Kochvereines 1. Kulinarischer Zirkel Regensburg e.V. seit 2004
Interessen	Klavier, Kochen, Reiten, Tauchen, Golf, Wandern, Design
EDV	ausgeprägte Kenntnisse in gängigen Office- sowie professionellen Grafik- und Layoutprogrammen

3.2 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Personen bedanken, die an dieser Arbeit beteiligt waren, mich unterstützt haben und meinen Weg zur Promotion letztlich ermöglicht haben.

Außerordentlichen Dank spreche ich meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. med. Sven A. Lang aus, der mich fachlich anleitete und stets als höchst qualifizierter und überaus freundlicher Ansprechpartner zur Verfügung stand.

Ein herzliches Dankeschön gilt Prof. Edward K. Geissler, PhD, dem Leiter der experimentellen Chirurgie, und dem Direktor der Klinik für Chirurgie, Prof. Dr. med. Hans Jürgen Schlitt, für die Ermöglichung der Experimente am Lehrstuhl.

Unmöglich wäre meine Laborarbeit ohne die tatkräftige und zuvorkommende Unterstützung der medizinisch technischen Assistentinnen Christine Wagner, Eva Scheiffert, Kathrin Stengel und vieler weiterer Mitarbeiter im Forschungsbau H4 gewesen.

Nicht zuletzt gilt besonderer Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mir während meines Studiums großen Halt und Unterstützung gaben.

3.3 Abdruck der Publikation

Auf den folgenden Seiten ist die dieser Zusammenfassung zugrunde liegende Originalarbeit wiedergegeben.

Targeting FGFR/PDGFR/VEGFR Impairs Tumor Growth, Angiogenesis, and Metastasis by Effects on Tumor Cells, Endothelial Cells, and Pericytes in Pancreatic Cancer

Johannes Taeger¹, Christian Moser¹, Claus Hellerbrand², Maria E. Mycielska¹, Gabriel Glockzin¹, Hans J. Schlitt¹, Edward K. Geissler¹, Oliver Stoeltzing³, and Sven A. Lang¹

Abstract

Activation of receptor tyrosine kinases, such as fibroblast growth factor receptor (FGFR), platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), and VEGF receptor (VEGFR), has been implicated in tumor progression and metastasis in human pancreatic cancer. In this study, we investigated the effects of TKI258, a tyrosine kinase inhibitor to FGFR, PDGFR, and VEGFR on pancreatic cancer cell lines (HPAF-II, BxPC-3, MiaPaCa2, and L3.6pl), endothelial cells, and vascular smooth muscle cells (VSMC). Results showed that treatment with TKI258 impaired activation of signaling intermediates in pancreatic cancer cells, endothelial cells, and VSMCs, even upon stimulation with FGF-1, FGF-2, VEGF-A, and PDGF-B. Furthermore, blockade of FGFR/PDGFR/VEGFR reduced survivin expression and improved activity of gemcitabine in MiaPaCa2 pancreatic cancer cells. In addition, motility of cancer cells, endothelial cells, and VSMCs was reduced upon treatment with TKI258. *In vivo*, therapy with TKI258 led to dose-dependent inhibition of subcutaneous (HPAF-II) and orthotopic (L3.6pl) tumor growth. Immunohistochemical analysis revealed effects on tumor cell proliferation [bromodeoxyuridine (BrdUrd)] and tumor vascularization (CD31). Moreover, lymph node metastases were significantly reduced in the orthotopic tumor model when treatment was initiated early with TKI258 (30 mg/kg/d). In established tumors, TKI258 (30 mg/kg/d) led to significant growth delay and improved survival in subcutaneous and orthotopic models, respectively. These data provide evidence that targeting FGFR/PDGFR/VEGFR with TKI258 may be effective in human pancreatic cancer and warrants further clinical evaluation. *Mol Cancer Ther*; 10(11): 2157–67. ©2011 AACR.

Introduction

Pancreatic cancer is the fourth leading cause for cancer-related death in the Western world (1). As conventional cancer treatments have little impact on disease course, almost all patients having pancreatic cancer develop metastases and die. To date, only surgical resection (possible in about 10%–20% of patients) can increase the 5-year survival rate from 3% to 20%; systemic chemotherapy and/or radiation may only allow a marginal increase in survival (2, 3). Therefore, new therapies based on the molecular biology of pancreatic cancer are needed to improve overall survival of patients with this aggressive disease.

In human pancreatic cancer overexpression of receptor tyrosine kinases (RTK), such as fibroblast growth factor receptor (FGFR), platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), and VEGF receptor (VEGFR), as well as their corresponding ligands, is a common event and is eventually associated with reduced patient survival (4–6). In particular, members of FGF family have been shown to contribute to tumor cell proliferation and resistance to chemotherapy in human pancreatic cancer cell lines (7, 8). Furthermore, as the FGF family comprises 23 different ligands, other members, such as FGF-7, have also been associated with an increase in tumor cell motility and enhancement of metastases (9). Therefore, targeting FGFR might improve current therapy concepts for patients with pancreatic cancer.

However, expression of FGFR/PDGFR/VEGFR is not limited to cancer cells. In fact, these receptor systems are crucial mediators of tumor angiogenesis, which is among the hallmarks of cancer (10, 11). With no doubt, VEGF-A is the major regulator in this complex process by direct effects on endothelial cells (12). However, there is increasing evidence that crosstalk between VEGFs and FGFs plays an important role in the promotion of tumor angiogenesis by mutually regulating their expression (13–16). In addition, recruitment of

Authors' Affiliations: Departments of ¹Surgery and ²Internal Medicine I, Regensburg University Hospital, Regensburg; and ³Department of Hepatobiliary Surgery, University of Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Note: J. Taeger and C. Moser contributed equally to this work.

Corresponding Author: Sven A. Lang, Department of Surgery, University of Regensburg Medical Center, Franz-Josef-Strauss Allee 11, 93042 Regensburg, Germany. Phone: 499419446801; Fax: 499419446802; E-mail: sven.lang@klinik.uni-regensburg.de

doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0312

©2011 American Association for Cancer Research.

pericytes [e.g., vascular smooth muscle cells (VSMC)] by PDGF-B is essential for maintenance of tumor angiogenesis, and cooperation of FGF-2 with PDGF-B has been shown to promote angiogenesis and metastasis formation in murine cancer models (17). Thus, targeting FGFR/PDGFR/VEGFR by a multiple RTK inhibitor (RTK) might be a promising approach for antiangiogenic therapy concepts.

TKI258 [(formerly CHIR258); 4-amino-5-fluor-3-[5-(4-methylpiperazin-1-yl)-1H-benzimidazol-2-yl]quinolin-2 (1H-one)] is an orally available ATP-competitive inhibitor with activity against class III, IV, and V RTKs including FGFR, PDGFR, and VEGFR (18). The substance has shown its antitumoral activity in various preclinical models including mammary tumors, multiple myeloma, and colon cancer models (19–21). Because of its inhibitory effects on multiple tyrosine kinases, TKI258 is thought to act on tumor cells and endothelial cells as well as pericytes.

In the present study, we assessed the combined antiangiogenic and antitumor activity of targeting FGFR/PDGFR/VEGFR with TKI258 in a pancreatic cancer model. *In vitro*, a substantial inhibition of motility and growth factor-induced signaling was observed. Furthermore, we evaluated its effects on tumor growth and metastasis in experimental murine models of subcutaneous and orthotopic pancreatic cancer *in vivo*. Results provide evidence that combined inhibition of FGFR/PDGFR/VEGFR might be a novel strategy to improve the outcome of patients with pancreatic cancer.

Materials and Methods

Cell culture and reagents

Human pancreatic cancer cell lines BxPC-3, MiaPaCa2, and HPAF-II were obtained from the American Type Culture Collection, and L3.6pl cells were kindly provided by Dr. I. J. Fidler (The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX). Human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC; endothelial cells) and VSMCs were purchased from PromoCell. No further authentication was done for tumor cell lines. Tumor cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; PAA Laboratories) supplemented with 15% fetal calf serum (FCS) and maintained in 5% CO₂ at 37°C as described (22). Recombinant human VEGF-A, PDGF-B, FGF-1, FGF-2, and FGF-7 were purchased from R&D Systems. The FGFR/PDGFR/VEGFR inhibitor TKI258 was kindly provided by Novartis Oncology and dissolved in dimethyl sulfoxide (*in vitro*) and water (*in vivo*), respectively (Fig. 1A).

MTT bromide assays

To evaluate cytotoxic effects of NVP-TKI258 on tumor cells, HUVECs and VSMCs, cells were seeded in 96-well plates (1 × 10³ per well) and exposed to various concentrations of TKI258. Respective concentrations of dimethyl sulfoxide were added to controls. We used the

MTT assay to assess cell viability as described before (22).

Migration assays

To determine the effect of TKI258 treatment on cell motility, migration assays were conducted using modified Boyden chambers as previously described (22, 23). Briefly, 5 × 10⁴ tumor cells were resuspended in 1% FCS-DMEM and seeded into inserts with 8-μm pores (Becton Dickinson Bioscience). In tumor cells, FGF-1 (50 ng/mL) and FGF-7 (50 ng/mL) were used as chemoattractants. After 24 and 48 hours, cells were fixed and migrated cells were stained (Diff-Quick reagent; Dade Behring). Cells that migrated through the filters were counted in 4 random fields and average numbers were calculated. In VSMCs, PDGF-B (10 ng/mL) and FGF-2 (50 ng/mL) were used as chemoattractants, whereas motility in endothelial cells was assessed with FGF-2 (50 ng/mL) and VEGF-A (50 ng/mL).

Western blot analyses for activated signaling pathways and receptor expression

Experiments were carried out at a cellular density of 60% to 70%. Unless otherwise indicated, cells were incubated with TKI258 (0.5 μmol/L) before stimulation with VEGF-A (10 ng/mL), PDGF-B (10 ng/mL), FGF-1 (50 ng/mL), or FGF-2 (50 ng/mL). Whole-cell lysates were prepared as described elsewhere (24). Protein samples (40 μg) were subjected to Western blotting on a denaturing 10% SDS-PAGE. Membranes were sequentially probed to indicated signaling intermediates with antibodies against phospho-Akt^{Ser473}, Akt, phospho-ERK^{Thr202/Tyr204}, ERK, phospho-STAT3^{Tyr705}, STAT3, N-Cadherin, E-Cadherin, survivin, phospho-c-Raf^{Ser289/296/301}, phospho-c-Raf^{Ser338}, c-Raf, phospho-FAK^{Tyr925}, FAK, FGFR3, EGF-R, and Hsp90 (Cell Signaling Technologies), and phospho-VEGFR2, VEGFR2, PDGFRα, PDGFRβ, and β-actin (Santa Cruz Biotechnologies). Antibodies were detected by enhanced chemiluminescence (Amersham Bioscience).

Real-time PCR analysis

Expression of FGFRs (FGFR1–3) and the effects of TKI258 on the expression of DLL4, survivin, FGF-2, epidermal growth factor (EGF), VEGF-A, PDGF-B, and Tie2 were determined by real-time PCR from cell culture and tumor tissue. For this purpose, total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen) and subsequently purified by ethanol precipitation. For each RNA sample, a 1 μg aliquot was reversely transcribed into cDNA using the Superscript II Kit (Qiagen). Selected primer pairs for PCR were as follows: DLL4 (5'-TGCAGGAGTTCAT-CAACGAG-3' and 3'-GAAATTGAAGGGCAGTTGGA-5'), survivin (5'-GGACCACCGCATCTCTACAT-3' and 3'-GACAGAAAGGAAAGCGCAAC-5'), FGFR1 (5'-CAACCGTGTGACCAAGTGG-3' and 3'-TCCGACAGGTCTTCTCCG-5'), FGFR2IIIb (5'-AAGGTTTACAGCGATGCCCA-3' and 3'-AGAGCCAGCACTTCTGC-ATT-5'), FGFR2IIIc (5'-GTGTTAACACCACGGACA-

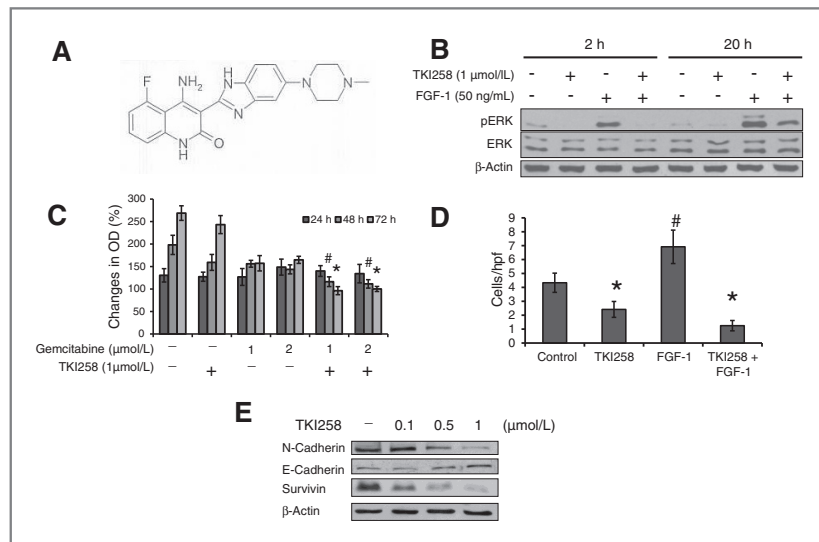


Figure 1. Effects of TKI258 on pancreatic cancer cells *in vitro*. **A**, structure of the FGFR/PDGFR/VEGFR inhibitor TKI258 (Reprinted with friendly permission from Novartis Oncology). **B**, Western blot analysis of signaling intermediates. Incubation of pancreatic cancer cells with TKI258 for 2 and 20 hours led to inhibition of constitutive and FGF-1-induced ERK phosphorylation. **C**, MTT assay of MiaPaCa2 showed improved growth inhibition upon combination of gemcitabine and TKI258 after 48 hours (#, $P < 0.05$) and 72 hours (*, $P < 0.05$). Bars, SEM. **D**, migration of pancreatic cancer cells upon stimulation with FGF-1 was significantly induced (#, $P < 0.05$). Treatment with TKI258 impaired constitutive and FGF-1-induced motility after 24 hours (*, $P < 0.05$). Bars, SEM. **E**, inhibition of FGFR/PDGFR/VEGFR with TKI258 for 24 hours diminished expression of N-cadherin and survivin in a dose-dependent manner. Results are shown for MiaPaCa2; similar results were obtained from BxPC-3 and HPAF-II (except for Fig. 1C). OD, optical density.

AA-3' and 3'-TGGCAGAACTGTCAACCATG-5'), FGFR3 (5'-GTGGCTGGAGCTACTTCC-3' and 3'-ATCCTTAGCCCAGACCGTGG-5'), FGF-2 (5'-AGCGGCTGTACTGCAAAAAC-3' and 3'-TTCTGCTTGAAGTTGTAGCTTGAT-5'), EGF (5'-AAGAATGGGGTCAACCAAGT-3' and 3'-TGAAGTTGGTTGCATTGACC-5'), Tie2 (5'-GAAGCCCCTGAACTGTGATG-3' and 3'-CTGGGCAAATGATGGTCTCT-5'), VEGF-A (5'-GCAGCTTGATTAAACGAACG-3' and 3'-GGTTCCCGAAACCCTGAG-5'), PDGF-B (5'-TCGAGTTGGAAAGCTCATCTC-3' and 3'-GTCTTGCACTCGGCGATTA-5') and GAPDH (5'-GCGGGGCTCCAGAACATCAT-3' and 3'-CCAGCCCCAGCGTCAAAGGTG-5'). Primers were optimized for MgCl₂ and annealing, and PCR products were confirmed by gel electrophoresis. Reverse transcriptase (RT)-PCR was done using the LightCycler System and Roche Fast-Start Light Cyclor-Master Hybridization Probes master mix (Roche Diagnostics).

Animal models

Eight-week-old male athymic nude mice (BALB/c *nu/nu*; Charles River) were used for experiments, as approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Regensburg and the regional authorities. In addition, experiments were conducted according to the "Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia" published by The United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research.

Effects of FGFR/PDGFR/VEGFR inhibition with TKI258 were first evaluated in an orthotopic pancreatic cancer model using metastatic L3.6pl cancer cells. Briefly, 1×10^6 human pancreatic cancer cells were injected into the pancreatic tail of mice. Mice were randomized into 3 groups ($n = 9-10$ per group) receiving either vehicle (controls) or TKI258 (15 mg/kg/d or 30 mg/kg/d) by oral gavage. Treatment started 7 days after tumor cell inoculation. After 31 days, mice were sacrificed, tumors excised and weighed, and incidence of liver and lymph node metastases was determined. Furthermore, tumors were either paraffin embedded or optimum cutting temperature embedded for immunohistochemical analyses. Effects of TKI258 on established orthotopic tumors were evaluated similarly ($n = 8$ per group). In this model, treatment (30 mg/kg/d) was initiated when tumors were palpable on day 15. Mice were individually assessed every day and sacrificed when signs of progressive tumor disease were observed. Tumors were excised, weighed, and prepared for Western blot analyses and PCR. PCR was carried out with pooled tissue samples from each group. Western blot analyses on tumor tissues were conducted as described elsewhere (22). Subsequently, the effects of FGFR/PDGFR/VEGFR inhibition with TKI258 on the growth of human pancreatic cancer cells (HPAF-II and L3.6pl) were investigated in subcutaneous tumor models. Cancer cells (1×10^6) were injected into the subcutis (right flank) of nude mice. In the first experiment with HPAF-II

cells, mice were randomized into 2 groups ($n = 7$ per group) receiving either vehicle (controls) or TKI258 (30 mg/kg, 3 times/week) by oral gavage. Treatment was started when tumors became palpable and was terminated on day 28. Within the second experiment, tumors (L3.6pl) were grown up to a size of 400 mm³, and subsequently treatment with either vehicle or TKI258 (30 mg/kg/d) for 7 days was initiated. Tumor diameters were measured every day and tumor volumes calculated ($\text{width}^2 \times \text{length} \times 0.5$). When the experiment was terminated, subcutaneous tumors were excised and weighed. For immunohistochemical analyses, tumors were either paraffin embedded or optimum cutting temperature embedded.

Immunohistochemical analysis of tumor vascularization and tumor cell proliferation

Multiple cryosections were obtained from tumors for all immunohistochemical analyses. CD31⁺ vessel area was assessed using rat anti-mouse CD31/PECAM-1 antibody (PharMingen) and peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) as previously described (24, 25). Antibody binding was visualized using stable diaminobenzidine. Images were obtained in 4 different quadrants of each tumor section (2 mm inside the tumor-normal tissue interface) at $\times 40$ magnification. Measurement of vessel area of CD31-stained vessels was done by converting images to gray scale and setting a consistent threshold for all slides using ImageJ software (version 1.33; NIH). Vessel areas were expressed as pixels per hpf (22). To determine the amount of proliferating tumor cells, mice received intraperitoneal injections of bromodeoxyuridine (BrdUrd; Sigma Aldrich; 1 mg per mouse) 2 hours before termination of animal studies. A commercially available BrdUrd detection kit (Becton Dickinson) was used to visualize BrdUrd uptake of cells in sections of tumors. Briefly, sections were incubated with anti-BrdUrd antibody solution, followed by streptavidin-conjugated horseradish peroxidase-linked goat anti-mouse IgG₂. Antibody binding was visualized by incubating slides in diaminobenzidine with the aid of hematoxylin counterstaining. BrdUrd-positive tumor cells were counted in 4 fields per tumor section at $\times 20$ magnification and averages were calculated (24, 25).

Statistical analysis

Statistical analyses were done using SigmaStat (version 3.0). Results of *in vivo* experiments were analyzed for significant outliers using the Grubb test (www.graphpad.com). Tumor-associated variables of *in vivo* experiments were tested for statistical significance using the Mann-Whitney *U* test for nonparametric data or ANOVA followed by the Tukey multiple comparison test for more than 2 groups. Effects on survival were determined by Kaplan-Meier analyses. The 2-sided Student *t* test was applied for analysis of *in vitro* data. All results are expressed as the mean \pm SEM.

Results

Treatment with TKI258 inhibits FGF signaling in tumor cells

To determine the effects of TKI258 on pancreatic cancer cell lines (BxPC-3, MiaPaCa2, HPAF-II, and L3.6pl), MTT assays were conducted for up to 72 hours. Results showed no effects on growth of cancer cells within the first 48 hours for concentrations up to 5 $\mu\text{mol/L}$. Incubation for longer time points reduced MTT signals starting at a concentration of 2 $\mu\text{mol/L}$ (data not shown). Hence, for further *in vitro* experiments, concentrations between 0.5 and 1 $\mu\text{mol/L}$ were used.

First, the expression pattern of FGFRs (FGFR1–3) in pancreatic cancer cell lines was determined by RT-PCR and Western blot, and results showed that all used cell lines express these receptors (data not shown). Because FGF-1 is an important mediator for tumor cell proliferation and resistance against chemotherapy in pancreatic cancer, we evaluated the impact of TKI258 on FGF-1-induced signaling in pancreatic cancer cell lines. Pretreatment of cancer cells with TKI258 for 2 and 20 hours impaired constitutive and FGF-1-induced activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK; Fig 1B). Of note, no phosphorylation of Akt was found upon treatment with FGF-1 (data not shown). Surprisingly, although all pancreatic cancer cell lines express PDGFR β , no activation of signaling intermediates was observed upon stimulation with PDGF-B (data not shown). To further address the issue of chemoresistance, combined treatment of MiaPaCa2 pancreatic cancer cells with TKI258 and gemcitabine was tested. This particular cell line was selected because a certain resistance of MiaPaCa2 against gemcitabine has been reported (26). In MTT assays, a significant growth inhibition upon combined incubation was detected after 48 and 72 hours compared with gemcitabine treatment alone (Fig. 1C). Similar results were obtained by counting cells upon incubation with gemcitabine, TKI258, or the combination (data not shown). Furthermore, a dose-dependent decrease in survivin expression was found in pancreatic cancer cells on an mRNA (data not shown) and protein level (Fig. 1E). We conclude from these data that blocking FGFR with TKI258 might improve therapy with gemcitabine in pancreatic cancer.

Effect of TKI258 on cancer cell motility

Signaling induced by FGF-1 is known to promote metastatic spread of cancer cells (27). Hence, we evaluated the effect of targeting FGFR on tumor cell motility using Boyden Chamber assays. Results showed that TKI258 impairs constitutive tumor cell motility after 24 and 48 hours (data not shown). In addition, FGF-1-induced tumor cell migration was significantly blocked by TKI258 (Fig. 1D). Similar results were obtained for FGF-7 induction of tumor cell motility (data not shown). To further determine the impact of TKI258 on constitutive

motility, N-cadherin and E-cadherin expression was determined in cancer cells. Interestingly, treatment with the inhibitor led to a dose-dependent downregulation of N-cadherin, whereas E-cadherin tended to be upregulated (Fig. 1E). Taken together, our results show that blockade of FGFR with TKI258 leads to significant reduction of cancer cell motility *in vitro*, which could play a part in potential antimetastatic effects *in vivo*.

TKI258 impairs activation of endothelial cells

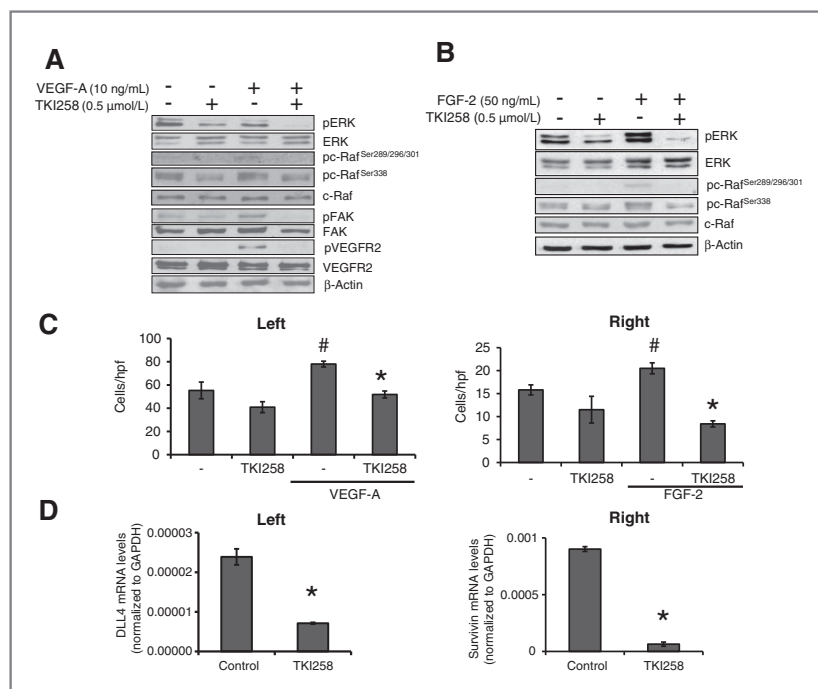
Induction of angiogenesis is important for tumor growth and metastases formation. Within this complex process, activation and recruitment of endothelial cells and pericytes is known to be crucial (12). Because TKI258 inhibits not only FGFR but also VEGFR, we next assessed its effects on endothelial cells. In MTT assays, treatment with the inhibitor only led to moderate growth-inhibitory effects of TKI258 on endothelial cells, similar to those on tumor cells, even upon stimulation with VEGF-A and FGF-2 (data not shown). However, Western blot analyses of endothelial cells upon stimulation with VEGF-A revealed an inhibition of VEGF-A-induced phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK). Furthermore, constitutive phosphorylation of c-Raf^{Ser289/296/301} and ERK was diminished (Fig. 2A). In addition, FGF-2-induced ERK and c-Raf^{Ser338} phosphorylation was impaired (Fig. 2B). On a functional level, motility of endothelial cells was induced by stimulation with either VEGF-A or FGF-2. This induction can be significantly impaired by

treatment with TKI258 (Fig. 2C, left and right). Moreover, as TKI258 exhibits effects on VEGFR/c-Raf and FGFR/c-Raf activation in endothelial cells, we sought to investigate whether this inhibitor might also modulate factors involved in resistance to anti-VEGF therapy and survival of endothelial cells (28). Therefore, RT-PCR was applied to determine expression of DLL4 and survivin in endothelial cells and a robust (>50%) downregulation was detected for both (Fig. 2D, left and right). In summary, treatment of endothelial cells with TKI258 impairs growth factor signaling leading to cell motility and shows promise to reduce endothelial factors involved in resistance to anti-VEGF therapy.

Impact of TKI258 on pericytes (VSMCs)

In addition to endothelial cells, pericytes are essential for development of tumor angiogenesis (29). Therefore, we included investigation of effects of TKI258 on this cell type into the study. Human VSMCs were used as a source of pericytes. Using MTT assays, only minor inhibition of growth was found upon treatment for 72 hours, even when cells were stimulated with PDGF-B and FGF-2 (data not shown). However, as both PDGF-B and FGF-2 are involved in VSMC recruitment, we next determined the effects of TKI258 on activation of signaling intermediates. Western blot analyses revealed an inhibition of PDGF-B-induced Akt and ERK phosphorylation, as well as a reduction in phosphorylated STAT3 (Fig. 3A). In contrast, stimulation with FGF-2 had no effect on activa-

Figure 2. Impact of TKI258 on endothelial cells *in vitro*. Western blot analysis of signaling intermediates. A, TKI258 led to inhibition of ERK and c-Raf phosphorylation. Furthermore, activation of FAK and VEGFR upon stimulation with VEGF-A (15 minutes) was impaired. B, after stimulation of endothelial cells with FGF-2 (15 minutes), TKI258 diminished phosphorylation of ERK and c-Raf. C, left, in migration assays, VEGF-A significantly induced motility of endothelial cells (#, $P < 0.05$), an effect that was reduced by treatment with TKI258 after 24 hours (*, $P < 0.05$). Right, similarly, TKI258 impaired endothelial cell migration upon stimulation with FGF-2 after 24 hours (# and *, $P < 0.05$). Bars, SEM. D, real-time PCR was used to investigate the effect of FGFR/PDGFR/VEGFR inhibition on DLL4 (left) and survivin (right) expression in endothelial cells; TKI258 (0.5 $\mu\text{mol/L}$; 24 hours) significantly diminished DLL4 (left) and survivin (right) mRNA (*, $P < 0.05$). Bars, SEM. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.



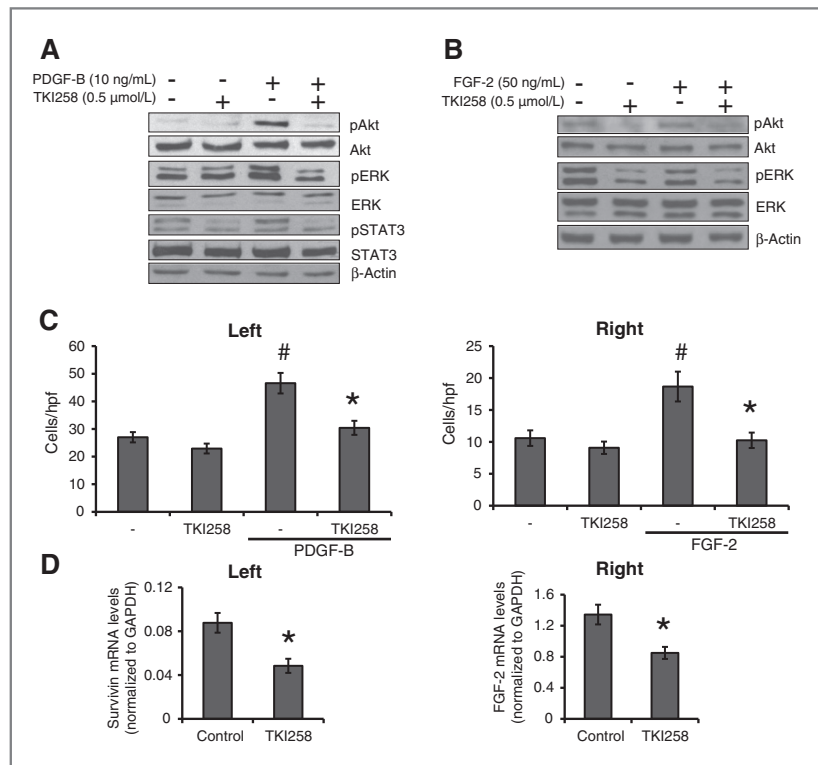


Figure 3. Effects of TKI258 on PDGF-B induced activation of VSMCs (VSMCs, pericytes). **A**, treatment with TKI258 impaired PDGF-B-induced activation of Akt and ERK; STAT3 phosphorylation was also reduced. **B**, after stimulation of VSMCs with FGF-2 (15 minutes), no effects on phosphorylation of ERK and Akt were observed. **C**, left, in migration assays, stimulation with PDGF-B significantly increased migration of VSMCs (#, $P < 0.05$), an effect that was abrogated by treatment with TKI258 (*, $P < 0.05$). Bars, SEM. Right, similarly, TKI258 impaired VSMC migration upon stimulation with FGF-2 after 24 hours. Bars, SEM. **D**, real-time PCR was used to investigate the effect of FGFR/PDGFR/VEGFR inhibition on survivin and FGF-2 expression in VSMCs; TKI258 (0.5 $\mu\text{mol/L}$; 24 hours) significantly diminished survivin (left) and FGF-2 (right) mRNA (*, $P < 0.05$). Bars, SEM. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

tion of either ERK or Akt in VSMCs (Fig. 3B). On a functional level, motility of VSMCs was significantly impaired upon treatment with TKI258, only when cells were stimulated with either PDGF-B or FGF-2 (Fig. 3C, left and right). In addition, expression of survivin mRNA was significantly reduced, similar to our findings in endothelial cells (Fig. 3D, left). Because pericytes are a major source of FGF-2 in tumors, we furthermore analyzed effects of targeting FGFR/PDGFR/VEGFR on FGF-2 mRNA expression in VSMCs. Results show a reduction in FGF-2 mRNA levels upon treatment with TKI258 (Fig. 3D right). We conclude from these experiments that TKI258 elicits effects on PDGF-B and FGF-2-induced pericyte recruitment.

Effects of FGFR/PDGFR/VEGFR inhibition on tumor growth

Our results so far indicate that treatment with a multi-tyrosine kinase inhibitor to FGFR/PDGFR/VEGFR might have significant effects on tumor growth, angiogenesis, and metastatic spread of pancreatic cancer. To further analyze this issue, an orthotopic pancreatic cancer model (L3.6pl) was used. Seven days after tumor cell implantation, mice were treated with 2 different doses of TKI258 (15 mg/kg/d and 30 mg/kg/d) or vehicle control. Upon termination of the experiment after 24 days of treatment

(31 days after tumor cell implantation), a significant inhibition of tumor weight was found in the higher dosing group (Fig. 4A). Although the lower dosing group also showed a reduced tumor weight, this did not reach statistical significance. Moreover, a dose-dependent reduction in both lymph node and liver metastases was found upon treatment with TKI258 (Table 1). In the higher dosing group, reduction of lymph node metastases was significant, whereas reduction of liver metastases was noted but not significant. To estimate the effects of our treatment on tumor vascularization, CD31⁺ vessel area was determined. Again, treatment with 30 mg/kg/d showed significant reduction in tumor vascularization, whereas lower dosing with 15 mg/kg/d showed no effect (Fig. 4B). In contrast, tumor cell proliferation determined by BrdUrd staining was significantly reduced at both 15 and 30 mg/kg/d treatments (Fig. 4C). To further exclude that antitumoral effects are cell line specific, a subcutaneous tumor model was used with HPAF-II cells. Consistent with our results from the orthotopic model, a significant inhibition of tumor growth was observed by treatment with TKI258 (30 mg/kg/d; Fig. 4D), which was also reflected by final tumor weight (data not shown). In summary, these experiments show a clear dose-dependent inhibition of tumor growth and metastatic spread by blockade of FGFR/PDGFR/VEGFR.

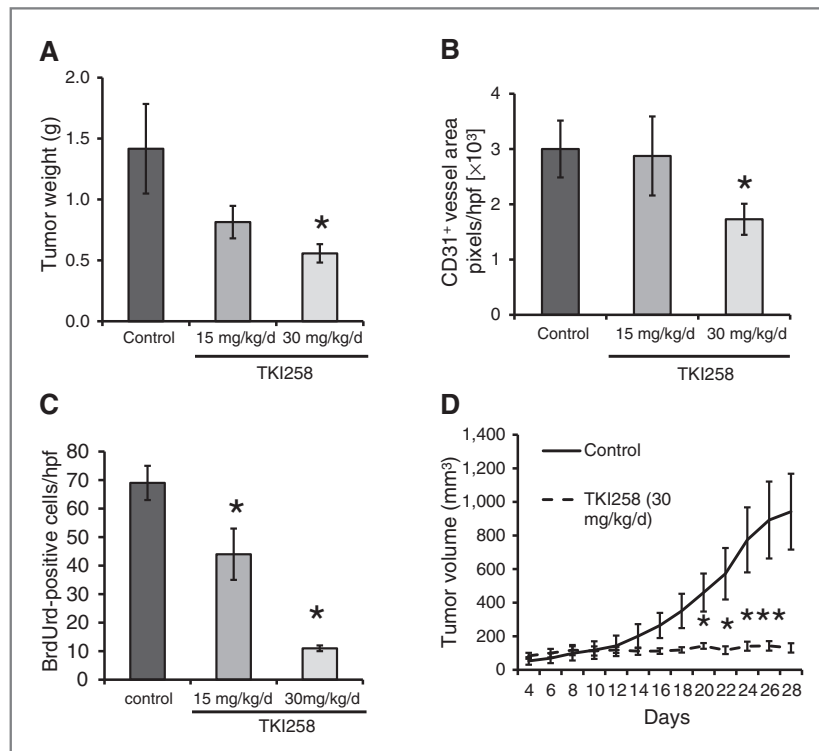


Figure 4. Effects of targeting FGFR/PDGFR/VEGFR *in vivo*. The effects of TKI258 on tumor growth and angiogenesis were determined in an orthotopic model of pancreatic cancer (L3.6pl). Mice ($n = 9-10$ per group) received either TKI258 (15 or 30 mg/kg/d) or vehicle by oral gavage starting at day 7 after tumor cell implantation. A, after 31 days, mice in the TKI258 (30 mg/kg/d) treatment arm showed a significantly reduced tumor burden (tumor weight) compared with mice in the control group (*, $P < 0.05$). Treatment with TKI258 (15 mg/kg/d) also showed reduced tumor growth, but this did not reach statistical significance. Bars, SEM. B, moreover, treatment with 30 mg/kg/d, but not 15 mg/kg/d, TKI258 significantly reduced tumor vascularization in terms of CD31⁺ vessel area (*, $P < 0.05$). Bars, SEM. C, both dosages of TKI258 significantly impaired tumor cell proliferation *in vivo* (*, $P < 0.05$). Bars, SEM. D, HPAF-II human pancreatic cancer cells were implanted into the subcutis of nude mice. Mice ($n = 7$ per group) received either TKI258 (30 mg/kg/d) or vehicle by oral gavage. Blocking FGFR/PDGFR/VEGFR significantly reduced the growth of subcutaneous tumors (*, $P < 0.01$). Bars, SEM.

TKI258 delays growth of established tumors

Because most of the patients with pancreatic cancer have large tumors that are not resectable upon diagnosis, we further assessed the effects of TKI258 on established subcutaneous tumors (L3.6pl). When tumor size reached to approximately 400 mm³, treatment was initiated with 30 mg/kg/d. Up to 4 days after initiation of treatment, no significant difference in tumor growth was observed. However, from a size of 600 mm³, TKI258-treated tumors stopped growing. After a total of 6 days of treatment, growth inhibition by TKI258 was significant compared with controls, although no tumor shrinkage in the treatment group was observed (Fig. 5A). When tumors were analyzed for proliferating tumor cells and tumor vascularization, a significant reduction of BrdUrd-positive cells and CD31⁺ vessel area was found (data not shown). These results were subsequently confirmed in an orthotopic tumor model. Control mice had to be sacrificed after a median of 23 days, whereas TKI258-treated mice

showed a median survival of 40 days. Consistent with results from the subcutaneous model, therapy with TKI258 (30 mg/kg/d) showed a delay in tumor growth that led to a significant improvement of survival in TKI258-treated mice ($P < 0.05$; Fig. 5B). In treated mice, after a longer time of survival, tumors were still slightly smaller than in untreated animals, although this difference was not significant (control: 1.38 ± 0.31 g vs. TKI258: 1.07 ± 0.23 g). In addition, a trend toward reduced metastasis was observed upon therapy with TKI258 (lymph nodes metastases: 6 of 8 controls vs. 3 of 8 in TKI258 group; liver metastases: 5 of 8 controls vs. 3 of 8 in TKI258 group). Again, this did not reach statistical significance, indicating only a sign of progressive disease. To further assess mechanisms of resistance development, Western blot analyses and PCR were carried out on tumor tissues. On a protein level, results showed that inhibition of FGFR/PDGFR/VEGFR led to downregulation of several growth factor receptors such as VEGFR2,

Table 1. Effects of targeting FGFR/PDGFR/VEGFR on liver and lymph node metastases in an orthotopic pancreatic cancer model (treatment started 7 days after tumor cell injection).

Treatment group	Control	TKI258 (15 mg/kg/d)	TKI258 (30 mg/kg/d)	P (control vs. 30 mg/kg/d)
Lymph node metastases	8/10 (80%)	5/10 (50%)	1/9 (11%)	0.0055 ^a
Liver metastases	6/10 (60%)	3/10 (30%)	1/9 (11%)	0.0573

^aThe Fisher exact test (control vs. 30 mg/kg/d).

PDGFR β , FGFR3, EGF receptor (EGFR), as well as reduced expression of Hsp90 and survivin in tumor tissue. In turn, TKI258-treated tumors showed an increase in PDGFR α expression (Fig. 5C). However, an upregulation of Tie2 (2-fold; Fig. 5D) and PDGF-B (3-fold) mRNA was observed, whereas VEGF-A, FGF-2, and EGF were slightly reduced upon FGFR/PDGFR/VEGFR inhibition (data not shown). Hence, our results clearly show that targeting

FGFR/PDGFR/VEGFR has the potential to impair tumor growth even in established tumors.

Discussion

Human pancreatic cancer remains associated with a high mortality as most patients present in advanced stages of the disease. Therefore, novel approaches are

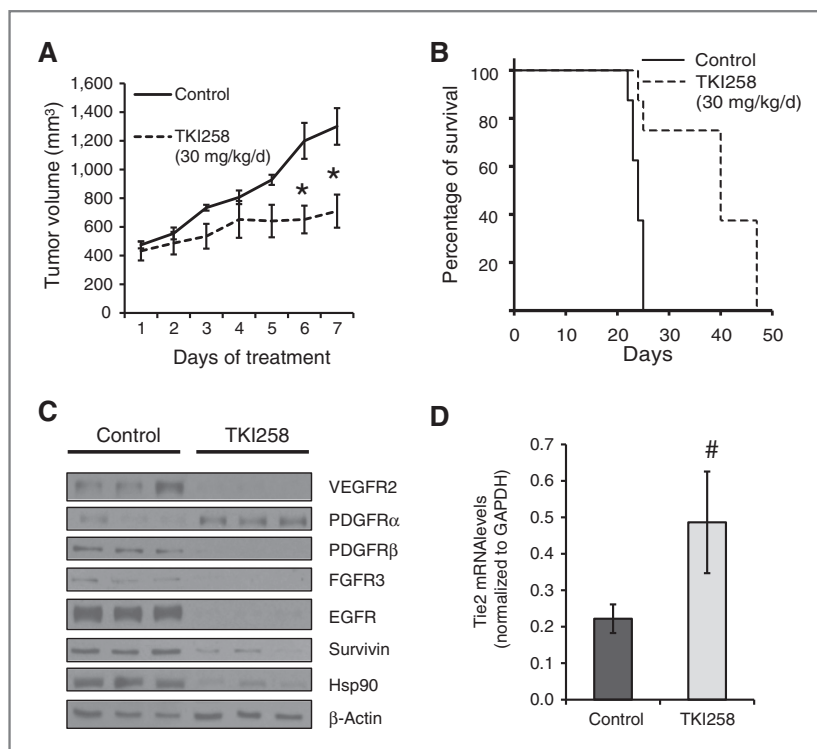


Figure 5. Impact of TKI258 on growth of established tumors *in vivo*. **A**, L3.6pl human pancreatic cancer cells were subcutaneously injected into the right flank of nude mice ($n = 5$ per group). Treatment (TKI258, 30 mg/kg/d) was started when tumors reached a size of 400 mm³. After 4 days of treatment, tumors did not differ in terms of tumor volume, but after 6 days, a significant growth inhibition with TKI258 therapy was observed (*, $P < 0.05$). Bars, SEM. **B**, in the orthotopic model, treatment of established tumor was initiated on day 15 after tumor cell injection ($n = 8$ per group). Treatment with TKI258 (30 mg/kg/d) led to a significant increase in survival rate of mice as shown in the Kaplan-Meier analyses ($P < 0.01$ vs. control). **C**, Western blot analyses of tumors from the orthotopic model show a decrease in expression of VEGFR2, PDGFR β , FGFR3, EGFR, survivin, and Hsp90 upon therapy with TKI258. In contrast, expression of PDGFR α was increased compared with controls. **D**, treatment with TKI258 led to a significant increase in Tie2 expression in orthotopic tumors (#, $P < 0.05$). Bars, SEM. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

needed to improve the prognosis for these patients. Within our current study, we assessed the effects of targeting FGFR/PDGFR/VEGFR by using a novel multi-tyrosine kinase inhibitor (TKI258) in pancreatic cancer models. Our results show that inhibition of these RTKs impairs multiple signaling pathways in tumor cells, endothelial cells, and pericytes. Furthermore, we found a dose-dependent inhibition of pancreatic cancer growth and metastasis formation *in vivo*. In addition, survival of mice with established orthotopic tumors was significantly improved. Taken together, our results suggest that the combination of targeting FGFR, PDGFR, and VEGFR might be a novel way to improve outcome of patients with pancreatic cancer.

Previous studies have shown the antitumoral activity of targeting multiple RTKs with TKI258 in a variety of tumor models (20, 21, 30). However, these studies focused on the inhibitory capacity of TKI258 on activation of PDGFR β and VEGFR2 (21, 30). In contrast, a recent report by Dey and colleagues describes that inhibition of FGFR in a breast cancer model is a crucial step for the antitumoral activity of TKI258 (20). In our model, we confirmed the effects of TKI258 on FGF-1-induced phosphorylation of ERK in tumor cells. Moreover, FGF-1-induced motility of pancreatic cancer cells was significantly suppressed by FGFR blockade with TKI258. However, in contrast to Dey and colleagues, we found no phosphorylation of Akt upon stimulation with FGF-1, which might be due to the fact that pancreatic cancer cells rely on other mechanisms of Akt phosphorylation than breast cancer cells (20). We can add from our experiments that a decrease in survivin expression may be a factor. This is of particular importance, as survivin is expressed in pancreatic adenocarcinoma and has been associated with resistance to chemotherapy and radiotherapy (31, 32). This observation is further underlined by the improvement of chemosensitivity to gemcitabine in Mia-PaCa2 cells. Therefore, our data indicate that targeting FGFR with TKI258 in pancreatic cancer cells reduces invasive properties and improves sensitivity to gemcitabine in pancreatic cancer cells.

FGF signaling is not only involved in motility and survival of tumor cells, but also it is a crucial component of tumor angiogenesis (10, 12). In particular, VEGF-A and FGF-2 are known to be major mediators of endothelial cell recruitment in terms of proliferation, migration, and survival (33). Alavi and colleagues have described a mechanism of chemoresistance in endothelial cells mediated via FGF-2-induced activation of Raf-1 (34), prompting our investigation into the effects of TKI258 on VEGF-A- and FGF-2-induced signaling. We found an inhibition of multiple signaling pathways including ERK, FAK, and c-Raf. On a functional level, TKI258 was able to reduce both VEGF-A- and FGF-2-induced endothelial cell migration. Moreover, upon treatment with this multi-kinase RTK inhibitor, a significant reduction in DLL4 and survivin expression was detectable. This is of particular interest, as DLL4 has been associated with resistance to

anti-VEGF therapy in some tumor models (28, 35, 36). In addition, pericytes (or VSMCs as representatives of pericytes) are essential components of tumor angiogenesis. In particular, Nissen and colleagues described a synergistic prometastatic and proangiogenic activity of PDGF-B and FGF-2 (17). Using TKI258, we found that activation of signaling intermediates Akt and ERK by PDGF-B was diminished. Furthermore, PDGF-B- and FGF-2-mediated motility of VSMCs was impaired. In view of these data, one might speculate that targeting FGFR, PDGFR, and VEGFR by TKI258 might improve current antiangiogenic therapy strategies in solid tumors.

We used an orthotopic tumor model to further evaluate our findings. The advantage of this model is the high metastatic potential combined with an appropriate microenvironment. As expected from our *in vitro* data, treatment with TKI258 led to a significant reduction in tumor growth in a dose-dependent manner. One might speculate that the improved inhibition at the higher dosing group (30 mg/kg/d) might be mediated via antiangiogenic effects, as CD31⁺ vessel area was only reduced in this group. However, the effective dose of TKI258 (30 mg/kg/d) is in the lower range than that described in former reports (20, 21, 30, 37). In this model, we also found a significant inhibition of metastasis formation in the lymph nodes and a trend to fewer liver metastases. These results are consistent with our *in vitro* data showing inhibition of tumor cell motility. However, several studies before have evaluated the effects of PDGFR and/or VEGFR inhibition on metastasis in pancreatic cancer models (23, 38–40). Although a strong inhibition of metastasis has been described by most of them, clinical studies did not confirm these findings (41–43). Nonetheless, in addition to targeting PDGFR/VEGFR, TKI258 elicits strong effects on FGFR, which adds a novel important antitumoral effect to our potential treatment arsenal.

Because most patients present in an advanced clinical stage of disease, we assessed effects of combined inhibition of FGFR/PDGFR/VEGFR on established tumors. First, treatment with 30 mg/kg/d led to a significant inhibition of subcutaneous tumor growth after 6 days of treatment. The reduced tumor cell proliferation and decreased vessel area observed in these established tumors support the idea of targeting FGFR/PDGFR/VEGFR in advanced disease states. These results were further confirmed for the first time in established orthotopic pancreatic tumors where TKI258 (30 mg/kg/d) significantly improved survival of mice. Although growth inhibition in established tumors upon TKI258 treatment has been reported in a model of colon cancer, 2- to 4-fold higher doses of the inhibitor were used in the model (21). It is, therefore, possible that inhibition of angiogenesis and tumor cell proliferation can be achieved far below the maximum tolerated dose, which is of particular interest as combination with conventional chemotherapy might improve these results. Furthermore, as TKI258 is effective against tumor angiogenesis, we sought to evaluate

mechanisms of resistance upon tumor progression in the orthotopic model. Recently, Cascone and colleagues showed that increased activity of EGFR and FGFR pathways is associated with resistance against VEGF inhibitors (44). Surprisingly, we detected a downregulation of FGFR3 and EGFR expression in our experiments. One might speculate that this is based on the fact that TKI258 blocks FGFR and PDGFR in addition to VEGFR. In contrast, an upregulation of PDGFR α in TKI258-treated tumors was detected that is of particular interest, as PDGFR α is associated with tumor progression and metastasis in various cancer entities (45, 46). Moreover, PDGFR α is the main receptor for PDGF-C, which in turn has been reported to be upregulated in tumor-associated fibroblasts that mediate resistance to anti-VEGF therapy (47). However, as mentioned above, dosing for TKI258 was chosen far below the maximum tolerated dose in our experiments, which offers the possibility to combine the inhibitor with conventional chemotherapy to further improve effects on survival. Nevertheless, taken together, our results clearly indicate that inhibition of multiple RTKs by TKI258 has the potential to impair tumor growth even in advanced stages.

In conclusion, the present study shows that targeting FGFR/PDGFR/VEGFR may lead to an effective inhibition of tumor growth and metastasis in pancreatic cancer even in advanced tumor stages. Inhibition of signaling in tumor cells, combined with antiangiogenic effects on

endothelial cells by disruption of FGF signaling and inhibition of DLL4 expression, may improve current antineoplastic therapy strategies for the treatment of patients with pancreatic cancer. These results provide evidence for the use of FGFR/PDGFR/VEGFR multitargeted kinase inhibitors in clinical trials for pancreatic cancer.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

S.A. Lang received other commercial support from Novartis Oncology. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Acknowledgments

The authors thank Christine Wagner, Eva Scheiffert, Katrin Enderle, and Kathrin Stengel for excellent technical assistance.

Grant Support

These studies were supported in part by the German Research Council (Deutsche Forschungsgemeinschaft to S.A. Lang and C. Hellerbrand), the German Cancer Aid (Deutsche Krebshilfe to O. Stoltzinger), and grants from the University of Regensburg, Medical Faculty (ReForM-A and ReForM-C to S.A. Lang, C. Moser, and C. Hellerbrand).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received April 24, 2011; revised August 19, 2011; accepted August 25, 2011; published OnlineFirst September 1, 2011.

References

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59:225-49.
- Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, Stewart AK, Winchester DP, Talamonti MS. National failure to operate on early stage pancreatic cancer. *Ann Surg* 2007;246:173-80.
- Cascinu S, Jelic S. Pancreatic cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009;20 Suppl 4:37-40.
- Giroux V, Dagorn JC, Iovanna JL. A review of kinases implicated in pancreatic cancer. *Pancreatol* 2009;9:738-54.
- Kuwahara K, Sasaki T, Kuwada Y, Murakami M, Yamasaki S, Chayama K. Expressions of angiogenic factors in pancreatic ductal carcinoma: a correlative study with clinicopathologic parameters and patient survival. *Pancreas* 2003;26:344-9.
- Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Beger HG, Uchida E, Onda M, et al. Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res* 1993;53:5289-96.
- El-Hariry I, Pignatelli M, Lemoine NR. FGF-1 and FGF-2 regulate the expression of E-cadherin and catenins in pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2001;94:652-61.
- Nomura S, Yoshitomi H, Takano S, Shida T, Kobayashi S, Ohtsuka M, et al. FGF10/FGFR2 signal induces cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2008;99:305-13.
- Niu J, Chang Z, Peng B, Xia Q, Lu W, Huang P, et al. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7-regulated cell migration and invasion through activation of NF-kappaB transcription factors. *J Biol Chem* 2007;282:6001-11.
- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3:401-10.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005;438:967-74.
- Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, et al. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res* 2008;68:918-26.
- Murakami M, Nguyen LT, Hatanaka K, Schachterle W, Chen PY, Zhuang ZW, et al. FGF-dependent regulation of VEGF receptor 2 expression in mice. *J Clin Invest* 2011;121:2668-78.
- Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* 1998;141:1659-73.
- Tsunoda S, Nakamura T, Sakurai H, Saiki I. Fibroblast growth factor-2-induced host stroma reaction during initial tumor growth promotes progression of mouse melanoma via vascular endothelial growth factor A-dependent neovascularization. *Cancer Sci* 2007;98:541-8.
- Nissen LJ, Cao R, Hedlund EM, Wang Z, Zhao X, Wetterskog D, et al. Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis. *J Clin Invest* 2007;117:2766-77.
- Renhowe PA, Pecchi S, Shafer CM, Machajewski TD, Jazan EM, Taylor C, et al. Design, structure-activity relationships and *in vivo* characterization of 4-amino-3-benzimidazol-2-ylhydroquinolin-2-ones: a novel class of receptor tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem* 2009;52:278-92.
- Chase A, Grand FH, Cross NC. Activity of TKI258 against primary cells and cell lines with FGFR1 fusion genes associated with the 8p11 myeloproliferative syndrome. *Blood* 2007;110:3729-34.
- Dey JH, Bianchi F, Voshol J, Bonenfant D, Oakeley EJ, Hynes NE. Targeting fibroblast growth factor receptors blocks PI3K/AKT signal-

- ing, induces apoptosis, and impairs mammary tumor outgrowth and metastasis. *Cancer Res* 2010 ;70:4151–62.
21. Lee SH, Lopes de Menezes D, Vora J, Harris A, Ye H, Nordahl L, et al. *In vivo* target modulation and biological activity of CHIR-258, a multi-targeted growth factor receptor kinase inhibitor, in colon cancer models. *Clin Cancer Res* 2005;11:3633–41.
 22. Lang SA, Moser C, Gaumann A, Klein D, Glockzin G, Popp FC, et al. Targeting heat shock protein 90 in pancreatic cancer impairs insulin-like growth factor-I receptor signaling, disrupts an interleukin-6/signal-transducer and activator of transcription 3/hypoxia-inducible factor-1 α autocrine loop, and reduces orthotopic tumor growth. *Clin Cancer Res* 2007;13:6459–68.
 23. Bauer TW, Liu W, Fan F, Camp ER, Yang A, Somcio RJ, et al. Targeting of urokinase plasminogen activator receptor in human pancreatic carcinoma cells inhibits c-Met- and insulin-like growth factor-I receptor-mediated migration and invasion and orthotopic tumor growth in mice. *Cancer Res* 2005;65:7775–81.
 24. Lang SA, Moser C, Fichtner-Feigl S, Schachtschneider P, Hellerbrand C, Schmitz V, et al. Targeting heat-shock protein 90 improves efficacy of rapamycin in a model of hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* 2009;49:523–32.
 25. Stoeltzing O, McCarty MF, Wey JS, Fan F, Liu W, Belcheva A, et al. Role of hypoxia-inducible factor 1 α in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:946–56.
 26. Giroux V, Malicet C, Barthet M, Gironella M, Archange C, Dagorn JC, et al. p8 is a new target of gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2006;12:235–41.
 27. Liu J, Huang C, Zhan X. Src is required for cell migration and shape changes induced by fibroblast growth factor 1. *Oncogene* 1999;18:6700–6.
 28. Yan M, Plowman GD. Delta-like 4/Notch signaling and its therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2007;13:7243–6.
 29. vonTell D, Armulik A, Betsholtz C. Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res* 2006;312:623–9.
 30. Lopes de Menezes DE, Peng J, Garrett EN, Louie SG, Lee SH, Wiesmann M, et al. CHIR-258: a potent inhibitor of FLT3 kinase in experimental tumor xenograft models of human acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 2005;11:5281–91.
 31. Liu WS, Yan HJ, Qin RY, Tian R, Wang M, Jiang JX, et al. siRNA directed against survivin enhances pancreatic cancer cell gemcitabine chemosensitivity. *Dig Dis Sci* 2009;54:89–96.
 32. Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, Davies CL, Markham AF, Guillou PJ. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002;86:886–92.
 33. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:159–78.
 34. Alavi AS, Acevedo L, Min W, Cheresch DA. Chemoresistance of endothelial cells induced by basic fibroblast growth factor depends on Raf-1-mediated inhibition of the proapoptotic kinase, ASK1. *Cancer Res* 2007;67:2766–72.
 35. Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, Coetsee S, Boland P, Gale NW, et al. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 2006;444:1032–7.
 36. Ridgway J, Zhang G, Wu Y, Stawicki S, Liang WC, Chantry Y, et al. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 2006;444:1083–7.
 37. Trudel S, Li ZH, Wei E, Wiesmann M, Chang H, Chen C, et al. CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4;14) multiple myeloma. *Blood* 2005;105:2941–8.
 38. Dineen SP, Sullivan LA, Beck AW, Miller AF, Carbon JG, Mamluk R, et al. The Adnectin CT-322 is a novel VEGF receptor 2 inhibitor that decreases tumor burden in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. *BMC Cancer* 2008;8:352.
 39. Hwang RF, Yokoi K, Bucana CD, Tsan R, Killion JJ, Evans DB, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor phosphorylation by STI571 (Gleevec) reduces growth and metastasis of human pancreatic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Clin Cancer Res* 2003;9:6534–44.
 40. Yokoi K, Sasaki T, Bucana CD, Fan D, Baker CH, Kitadai Y, et al. Simultaneous inhibition of EGFR, VEGFR, and platelet-derived growth factor receptor signaling combined with gemcitabine produces therapy of human pancreatic carcinoma and prolongs survival in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res* 2005;65:10371–80.
 41. Al-Batran SE, Atmaca A, Schleyer E, Pauligk C, Hosius C, Ehninger G, et al. Imatinib mesylate for targeting the platelet-derived growth factor beta receptor in combination with fluorouracil and leucovorin in patients with refractory pancreatic, bile duct, colorectal, or gastric cancer—a dose-escalation Phase I trial. *Cancer* 2007;109:1897–904.
 42. Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D, Sutherland S, Schrag D, Hurwitz H, et al. Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J Clin Oncol* 2010 ;28:3617–22.
 43. Kindler HL, Wroblewski K, Wallace JA, Hall MJ, Locker G, Nattam S, et al. Gemcitabine plus sorafenib in patients with advanced pancreatic cancer: a phase II trial of the University of Chicago Phase II Consortium. *Invest New Drugs* 2010 Aug 28. [Epub ahead of print].
 44. Cascone T, Herynk MH, Xu L, Du Z, Kadara H, Nilsson MB, et al. Upregulated stromal EGFR and vascular remodeling in mouse xenograft models of angiogenesis inhibitor-resistant human lung adenocarcinoma. *J Clin Invest* 2011;121:1313–28.
 45. Carvalho I, Milanezi F, Martins A, Reis RM, Schmitt F. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in breast cancer is associated with tumour progression. *Breast Cancer Res* 2005;7:R788–95.
 46. Zhang T, Sun HC, Xu Y, Zhang KZ, Wang L, Qin LX, et al. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha in endothelial cells of hepatocellular carcinoma associated with high metastatic potential. *Clin Cancer Res* 2005;11:8557–63.
 47. Crawford Y, Kasman I, Yu L, Zhong C, Wu X, Modrusan Z, et al. PDGFC mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell* 2009;15:21–34.